

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: NBOTA



BC. HANA PŘÍVOZNÍKOVÁ

DIFERENCIACE V POLYPLOIDNÍM KOMPLEXU *LIBANOTIS PYRENAICA*
(APIACEAE)

DIFFERENTIATION IN THE POLYPLOID COMPLEX *LIBANOTIS PYRENAICA*
(APIACEAE)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: MGR. JINDŘICH CHRTEK, CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15/8/2016

Podpis:

*Bílá mrkev oku skryta
v rohu hradu tiše rostla
zažila snad pány z Dubé,
i mravy divně nahnuté.*

*V stínu zdi jen sílila,
aby jednou vykvetla.
A když nastal správný čas,
odhodila cudný pás.*

*Takového množství hmyzu,
takového bzukotu,
nikdá jindy stěny hradu
nespatřily nádheru.*

*A v tu chvíli šla jsem kolem
s gpskou u pasu,
vytáhla jsem z kapsy sáček
a maličkou lopatku.*

*Krasavice mezi všemi
jíž se slunce ukloní
navěky dnes bude sama
v herbáři nám dále žít.*



Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala v první řadě svému školiteli Jindřichu Chrtkovi, bez něhož by tato práce nikdy nevznikla, za jeho obětavost, zapálenost pro věc, veškeré cenné rady a ochotu kdykoliv s čímkoliv pomoci a za nakažlivý neutuchající optimismus.

Mé poděkování patří všem, kteří mě trpělivě vyváděli ze slepých uliček a dokázali mi jakkoliv poradit či pomoci (mé díky patří cytometrické laboratoři UK i v Průhonicích, Lence Flaškové z laboratoře UK, Lence Moravcové z Průhonic, Filipu Kolářovi, Karolu Krakovi a mnohým dalším a dalším).

Můj vděk si také zaslouží molekulární laboratoře UK, které jsem příležitostně navštěvovala, areál na Chotobuzi, kde mi zahradníci v době mé nepřítomnosti střežili rostlinstvo a samozřejmě UK a grantová agentura UK (GAUK č. 1578714), bez jehož finanční pomoci by práce nemohla vzniknout.

Samozřejmě také nesmím zapomenout na ty, kteří při svých toulkách přírodou potkali žebřici a neváhali a přivezli mi ji nebo mi byli jakýmkoliv jiným způsobem nápomocni.

A konečně bych touto cestou ráda poděkovala své rodině za neutuchající podporu i shovívavost a hlavně svému příteli Lukáši Němečkovi zejména za vyčerpávající pomoc v terénu, za hodiny strávené nad mapami a za všechna ta krásná místa, kam jsme se díky této práci dostali.

Obsah

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1. Úvod	9
1.1. Polyploidie.....	9
1.2. Rod <i>Libanotis</i>	10
1.3. <i>Libanotis pyrenaica</i>	11
1.3.1. Morfologická charakteristika.....	11
1.3.2. Ekologie.....	13
1.3.3. Variabilita.....	14
1.3.4. Obsahové látky a ekonomický význam.....	15
1.3.5. Rozšíření.....	16
1.3.5.1. Rozšíření <i>Libanotis pyrenaica</i> v ČR	17
1.3.5.2. Rozšíření <i>Libanotis pyrenaica</i> v dalších zemích	18
1.4. Jedinečnost tématu – proč právě studie <i>Libanotis pyrenaica</i>	21
2. Cíle práce.....	23
3. Cytogeografie a genetická diversita	24
3.1. Úvod.....	24
3.1.1. Ploidní variabilita na vnitrodruhové úrovni.....	24
3.1.2. Ploidní variabilita u <i>Libanotis pyrenaica</i>	25
3.2. Materiál a metodika.....	28
3.2.1. Rostlinný materiál	28
3.2.2. Průtoková cytometrie.....	28
3.2.3. Analýza cpDNA.....	43
3.2.3.1. Izolace DNA, gelová elektroforéza a vizualizace DNA, PCR, purifikace ..	43
3.2.3.2. Analýza dat.....	46
3.3. Výsledky.....	47
3.3.1. Cytogeografie.....	47
3.3.2. Analýza cpDNA.....	51
3.4. Diskuze.....	61
3.5. Morfometrika.....	68
3.5.1. Měření pěstovaných rostlin.....	68
3.5.1.1 Metodika.....	68
3.5.1.2 Výsledky.....	70
3.5.1.3 Diskuze.....	75
3.5.2 Merikarpia.....	75
3.5.2.1 Metodika.....	76
3.5.2.2 Výsledky.....	76
3.5.2.3 Diskuze.....	77
4. Plovatelnost.....	79
4.1. Úvod.....	79
4.2. Materiál a metodika.....	80
4.3 Výsledky.....	81
4.4 Diskuze.....	82
5. Klíčení semen v experimentálních podmínkách.....	85
5.1 Metodika.....	85
5.2 Výsledky	86
5.3 Diskuze.....	90
6. Pár slov ke květní biologii, opylování a heteroploidnímu křížení.....	91

6.2 Heteroploidní křížení v rámci jednoho druhu.....	92
6.3 Metodika	93
6.4 Předběžné výsledky a diskuse.....	93
7. Závěr.....	95
8. Seznam použité literatury.....	97
8.1 Seznam použitých webových stránek.....	105
8.2 Seznam map k rozšíření <i>Libanotis pyrenaica</i>	106
9. Přílohy.....	107
9.1 Obrazová příloha.....	107
9.2 Tabulky.....	113

Abstrakt

Polyploidizace patří u rostlin mezi hlavní evoluční mechanismy. V čeledi Apiaceae není častá, mezi zajímavé polyploidní komplexy tu patří *Libanotis pyrenaica*, s doposud zjištěným diploidním ($2n = 2x = 22$), tetraploidním ($2n = 4x = 44$) a vzácně i triploidním ($2n = 3x = 33$) cytotypem. Předložená diplomová práce se zaměřila na geografický pattern ploidní diferenciace ve střední Evropě, genetickou variabilitu a některé biologické vlastnosti tohoto druhu. Použita byla metoda průtokové cytometrie, analýzy dvou úseků chloroplastové DNA (trnF-trnL a cp018-cp020), morfometrika a analýza klíčivosti semen v experimentálních podmínkách.

Diploidní cytotyp byl zjištěn v celé zkoumané oblasti; v České republice zejména v Českém středohoří, jižních Čechách a roztroušeně na Moravě, na Slovensku zejména v karpatské oblasti na západní a střední části státu a v Pieninách. Tetraploidní cytotyp se vyskytuje hlavně ve východní části střední Evropy; v České republice se vyskytuje hlavně ve východním Polabí a v okolí moravských úvalů; na Slovensku zejména v Pováží, Slovenském rudohoří a Belanských Tatrách. Smíšená populace byla nalezena jen jedna (Polsko), bez objevení triploidních rostlin. Diploidní populace jsou vesměs vázané na přirozená stanoviště, tetraploidní naopak na člověkem často do značné míry ovlivněná stanoviště. Genetická diversita sekvenovaných úseků cpDNA je vysoká, fylogenetické vztahy ale nejsou vyjasněné. Zčásti podpořená skupina zahrnuje haplotypy rozšířené zejména ve východní části střední Evropy. Klíčivost semen je ovlivněna teplotou (lépe klíčí při vyšších teplotách), ploidií (obecně vyšší klíčivost tetraploidních semen) a stratifikací (stimuluje klíčení). Cytotypy se tedy zřejmě liší svými ekologickými nároky a to hlavně s ohledem na teplotu, což může být důvod, proč jsou tetraploidi častěji nalézáni v nížinách a diploidi i ve vyšších polohách. Diploidi a tetraploidi se liší i morfologicky, naopak rozdíl nebyl zjištěn v plovatelnosti semen. Práce je příspěvkem k poznání polyploidní evoluce a fytogeografie střední Evropy.

Klíčová slova: Apiaceae, cpDNA, diploid, disperze semen, dynamika klíčení, *Libanotis pyrenaica*, morfometrika, průtoková cytometrie, rozdílnost mezi cytotypy, *Seseli*, tetraploid, žebřice pyrenejská

Abstract

Polyploidization belong to principal evolutionary mechanisms in plants. Although it is rather rare in the family Apiaceae, there are several interesting polyploid complexes here. The present study deals with *Libanotis pyrenaica*, species three previously reported ploidy levels, namely diploid ($2n = 2x = 22$), tetraploid ($2n = 4x = 44$) and most likely very rare triploid ($2n = 3x = 33$). The present study aims at geographical pattern of ploidal diversity in central Europe, genetic variation and selected biological features of this species. Flow cytometry, analysis of two chloroplast DNA markers (trnF-trnL and cp018-cp020), morphometrics and in vitro germination experiments were used. The tetraploid cytotype occurs throughout the studied area; in the Czech Republic it was found in the České středohoří Mts., southern Bohemia and Moravia, in Slovakia it especially in the Carpathian mountains in western and central parts of the country and in the Pieniny Mts. in the northeast. Tetraploid cytotype occurs mainly in central-east Europe; in the Czech Republic it is common in the lowlands along the river of Labe and locally in Moravia; in Slovakia it was found along the river of Váh, in the Slovenské rudohorie Mts. and in the Belanské Tatry Mts. A mixed-ploidy population ($2x$, $4x$) was discovered in southern Poland, no triploid were found. Genetic diversity in the two cpDNA markers is high, but phylogeny is rather unresolved; partly supported group consists of haplotypes distributed mainly in central-eastern Europe. Seed germination is determined by ploidy level, temperature and stratification. The ploidy levels also differ in some morphological character. There are not differences in seed buoyancy between the cytotypes. The study is a contribution to our knowledge of polyploid evolution and central European phytogeography.

Key words: Apiaceae, cpDNA, cytotype differentiation, diploid, flow cytometry, germination dynamics, *Libanotis pyrenaica*, Moon Carrot, morphometry, seed dispersal, *Seseli*, tetraploid

1. Úvod

1.1. Polyploidie

Jedním ze základních evolučních procesů je polyploidizace. Polyploidie je přítomnost tří či více kompletních chromozomových sad v jádru buněk (Comai 2005). Vzniká buď duplikací genomu v rámci jednoho druhu, ekotypu nebo populace (autopolyploidie), anebo spojením genomů dvou různých druhů během hybridizace a následnou duplikací hybridního genomu (alopolyploidie). V současné době se předpokládá, že jedním nebo více polyploidizačními cykly prošla většina krytosemenných rostlin – mezi krytosemennými rostlinami je až 80 % polyploidů, mnohem méně polyploidních skupin se nachází mezi nahosemennými (Soltis & Soltis 1999, Otto & Whitton 2000, Soltis et al. 2009, Soltis & Soltis 2012).

Polyploidní rostliny mají nebo mohou mít ve srovnání s diploidními mnohé výhody, často podmiňující jejich větší evoluční úspěšnost. Obvykle mají lepší preadaptaci pro osídlování širšího spektra stanovišť, včetně ekologicky extrémních; lepší schopnost k lokálním adaptacím (Levin 2002, Ramsey & Schemske 2002) je způsobena zejména větší genetickou plasticitou a širší ekologickou tolerancí vůči stresovým faktorům. Polyploidní druhy/cytotypy často mívají větší květy (a tudíž se stávají atraktivnějšími pro opylovače), větší semena umožňující rychlejší růst semenáčků (naopak ale mívají růstovou rychlost obvykle menší než diploidi, mj. kvůli složitějšímu dělení jader v závislosti na větším obsahu DNA a zároveň potřeby většího množství živin, Levin 2002), často obývají jiný – i extrémnější – typ stanovišť, mívají jiné složení sekundárních metabolitů (nezřídka v souvislosti s herbivorií apod.), hormonální a fotosyntetickou aktivitu, jinou fenologii nebo odlišný způsob reprodukce (často ztrácí autoint kompatibilitu). Zastoupení polyploidů obecně stoupá s rostoucí zeměpisnou šířkou (na severní polokouli) a v některých územích i se zvyšující se nadmořskou výškou (Otto & Whitton 2000). Předpokládá se totiž, že výkyvy prostředí mohou podporovat tvorbu neredukovaných gamet (Mable 2004). Právě odlišné vlastnosti cytotypů umožnily etablování polyploidů vznikajících sympatricky v diploidních populacích (obejití minority cytotype exclusion, pre- a postzygotické bariéry). Současné mohou některé z těchto vlastností podmiňovat rychlejší šíření polyploidů; v některých případech se může jednat i o rozsáhlé invaze (Treier et al. 2009) nebo expanze (např. Schlaepfer et al. 2010, Te Beest et al. 2012).

Polyploidie nejčastěji vznikají splynutím neredukovaných gamet u diploidních rostlin. Za vznikem neredukovaných gamet se mohou skrývat meotické poruchy nebo některé vnější faktory (např. stres, teplotní výkyvy apod.). S tím souvisí i meziroční kolísání tvorby neredukovaných gamet – frekvence vzniku bývá odhadována na 0,56 (Levin 2002).

K polyploidizaci může docházet jak splynutím dvou neredukovaných gamet, tak i přes tzv. triploidní most (triploid bridge, Husband 2004), kdy splývá neredukovaná gameta s redukovanou ($2n + n$ gamety). Později mohou dalším křížením přes takto vzniklou triploidní rostlinu vznikat tetraploidi. Asi nejméně častým způsobem vzniku polyploidů je pak somatická polyploidizace, např. duplikací chromozomů v raném stádiu zygoty (Mráz 2012).

Přestože je polyploidizace u rostlin velmi častá, v čeledi Apiaceae se s ní setkáváme podle literárních údajů velmi výjimečně (zatím zjištěna v rodu *Bupleurum*, a v družích *Libanotis pyrenaica*, *Pimpinella saxifraga*), větší pozornosti se ovšem dostalo snad jen druhu *Pimpinella saxifraga* (Mozolová 2007), u něhož byly nalezeny diploidní i tetraploidní jedinci mj. v České republice.

1.2. Rod *Libanotis*

Rod *Libanotis*, některými autory slučovaný s rodem *Seseli*, patří do kosmopolitně rozšířené čeledi Apiaceae, podčeledi Apioideae, subtribus Seselinae. Ve starší literatuře převládá samostatně pojímaný rod *Libanotis* (Presl 1846, Opiz 1852, Dostál 1950, Dostál 1958, Slavík & Tomšovic 1997), s nímž se mj. z tradičních důvodů setkáváme i v současnosti zejména v českých zemích (Kubát et al. 2002, Danihelka et al. 2012). Samostatný rod *Libanotis* se od rodu *Seseli* v užším pojetí vymezuje na základě přítomnosti obalu, tvaru kališních cípů, odění dvounažek a typu pylových zrn.

Proti tomuto názoru se již dříve vyslovalo více autorů (např. Pardo 1981, Fröberg 2008 – www 2) a dnes převládá slučování obou rodů do široce pojatého rodu *Seseli* (v evropské literatuře např. nová vydání německého (Jäger 2011) a rakouského klíče (Fischer et al. 2008). Naproti tomu francouzská monografie čeledi se přidrží samostatných rodů *Seseli* a *Libanotis* (Reduron 2008). Široce pojatý rod *Seseli* (incl. *Libanotis*) čítá cca 96–118 druhů (She et al. 2005), rod *Libanotis* 10–30 druhů (Bobrov et al. 1973; Slavík & Tomšovic 1997, She et al. 2005). Rod *Libanotis* je rozšířen v mírném pásu Eurasie a v severní Africe (Bonnier 1911, Meusel et al. 1978a,b; www 6), zavlečen byl do východní části Severní Ameriky (Uhrová 1984, Sell & Murrell 2009).

1.3. *Libanotis pyrenaica*

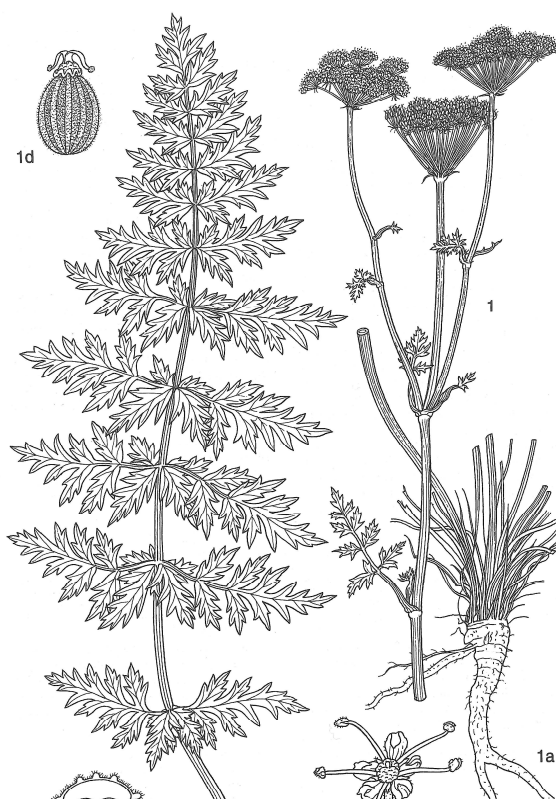
1.3.1. Morfologická charakteristika

Morfologická charakteristika je sestavena podle prací Dostál 1950, Kovaříková 1978, Hlavaček et al. 1984, Uhrová 1984, Slavík & Tomšovic 1997 a Reduron 2008 s přihlédnutím k vlastním pozorováním.

Libanotis pyrenaica (obr. 1) je obvykle monokarpická rostlina dorůstající nejčastěji (30–)60–120(–150) cm (často i přes 2 metry – vlastní pozorování). Lodyha je přímá, výrazně žebrovaná, obvykle bohatě větvená, pýřitá nebo lysá, někdy nachově naběhlá (podobně bývají naběhlé též řapíky listů), na bázi s čupřinou vláken (zbytky odumřelých listů). Kořen je jemně kroužkovaný, bílý, vonící po mrkvi, obvykle krátký a široký (v závislosti na substrátu).

Přízemní listy jsou řapíkaté, s čepelí v obrysu eliptickou až široce eliptickou, (25–)30–38(–57) cm dlouhou, 15–35 cm širokou, u rostlin z ČR nejčastěji 2× zpeřenou, méně často jednoduše zpeřenou a vzácně 3× zpeřenou, pýřitou nebo lysou. Úkrojky jsou úzce eliptické až vejčité, nejdolejší pár lístků je u větene v křížovém postavení (tj. dolní úkrojek je výrazně větší než ostatní, nejmladší listy jej ale nemusí mít vyvinuté). Řapík je víceméně oblý, s výrazným žlábkem, u lodyžních listů přecházející v objímavou pochvu.

Okolíky jsou složeny z 20–40(–70) okolíčků. Počet listenů obalu je značně proměnlivý. Květena ČR (Slavík & Tomšovic 1997) uvádí, že obaly jsou složeny z 5–8 brvitých listenů, Uhrová (1984) se zmiňuje o počtu 8 a více, dlouhých 5–15 mm. Já jsem pozorovala od jediného listenu obalu po 21. Občas dochází ke srůstům, někdy jsou obaly jen jazykovité, jindy jsou mnohokrát členěné. Zdá se, že není nikterak ustálen



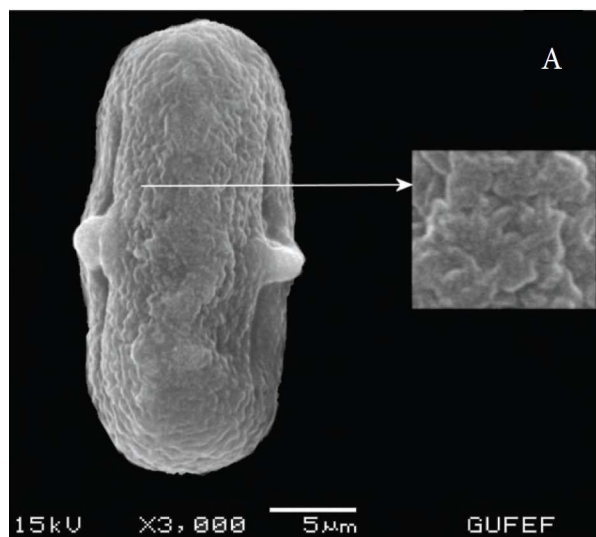
Obr. 1: *Libanotis pyrenaica* (převzato ze Slavík & Tomšovic 1997). 1 Lodyha s okolíky, 1a kořen s čupřinou odumřelých listů, 1b list, 1c květ, 1d schizokarp, 1e příčný řez plůdkem.

počet listenů, ale vždy (nebo téměř vždy) je listenů obalu méně než listenů obalíčku. Okolíky mají stopku 3–6 cm dlouhou, krátce chlupatou. Okolíčky jsou složeny z (30–)35–45 (dle pozorování i více než z padesáti) květů, jejich obalíčky z přibližně 10–18 listenů, které dosahují délky květní stopky, nebo jsou delší (Slavík & Tomšovic 1997).

Na rostlině vykvétá postupně mnoho okolíků (pozorovala jsem od 12 do 145 okolíků). Další větve s okolíky se tvoří občas ještě v době, kdy hlavní terminální okolík již usychá. Obvykle mívá rostlina více než 10 postranních větví.

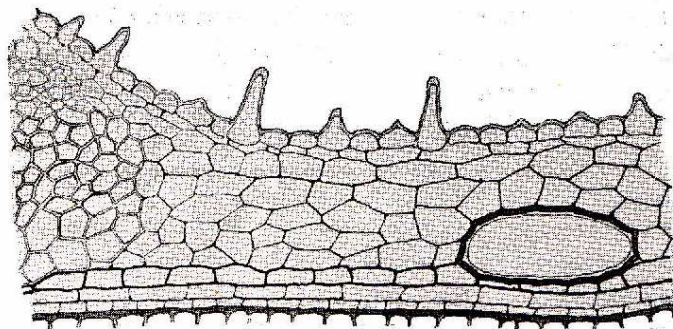
Květy jsou oboupohlavné, pětičetné (s výjimkou gynecia). Kališní lístky jsou čárkovité až vejčité kopinaté, pýřité, až 1 mm dlouhé, za plodu opadavé. Korunní lístky jsou okrouhle vejčité, asi 1 mm dlouhé, bílé nebo růžové, krajní maličko paprskující se zubem z přebytku pletiva. Samčí květní fáze předchází samičí. Průběžně dozrávají jednotlivé tyčinky (a postupně se narovnává a prodlužuje nitka), po prasknutí pylových váčků a vysypání pylu opadávají. Délka nitky prašníku dosahuje 1,73–1,87 mm, délka prašných váčků 0,3–0,6 mm (vlastní pozorování, podle tří tyčinek z jednoho květu z 25 rostlin, vždy ve vyvinutém stavu před úplnou zralostí na terminálním okolíku). Samičí fáze se projevuje prodlužováním čnělky, receptivní blizna bývá mírně mléčně zakalena. V době zralosti se v květu už obvykle tyčinky nenacházejí (nebo pouze jednotlivě) a okvětní lístky bývají povadlejší, záhy opadávají. Ve středu každého květu se nacházejí dva pestíky.

Plodem je vejcovitý až elipsoidní schizokarp, 2,5–3 mm široký a 3–3,5 mm dlouhý, oděný krátkými chlupy, s tupými málo vyniklými žebry (obvykle třemi), na vrcholu lehce šídlovitý. Epidermis se skládá z poměrně širokých nekolabujících buněk, vytvářejících krátké rovné chlupy až papilovité útvary (viz obr. 3). Kutikula není pilovitě zoubkovaná (zoubkovaná např. u *Seseli hippomarathrum*). Perikarp je široký – mezokarp o 5–6 řadách buněk, úzká hypodermis, endodermis lemována úzkou vrstvou obdélníkovitých buněk se ztloustlými a lignifikovanými buněčnými stěnami, tato vrstva se zužuje až kolabuje pod sekrečními kanálky. Na rozdíl od jiných seselů nad sekrečními kanálky má mezokarální pletivo nerozlišené. Sekreční kanálky jsou kruhové či smáčklé o průměru 180–200 μm obvykle po jednom (či dvou) ve valekulách a v obou komisurálních polovinách. V žebrech



Obr. 2: Pyl *Libanotis pyrenaica* (SEM).
Převzato z Doğan Güneret 2011.

nad cévními svazky sekreční kanálky chybí. Endokarp je do 15 μm široký (oproti *Seseli osseum* – 30 μm), úzká nekolabující testa, ale široká výživná vrstva (Klan 1947).



Obr. 3: Řez semenem *Libanotis pyrenaica*. Přejato z Klan 1947. Nekolabující epidermis, úzký endokarp a nekolabující testální vrstva, při endokarpu úzké protáhlé ztloustlé buňky.

Schizokarp bývá 1,5–2,5 mm široký, obvykle hustě chlupatý, po dozrání se poltí na dva merikarpy, které jsou kratičce chlupaté, později olýsávající. Čnělka je vždy napět ohnutá podél perikarpu, dosahuje přibližně 1/3 délky plodu, žebra jsou úzká a světlejší, rýhy (valekuly) široké, hnědočervené (o problematice variability plodů pojednává mj. Duvigneaud (1965).

Pyl typu *Libanotis* (obr. 2) má dlouhou ektoaperturu, eliptickou endoaperturu, krátké collumely na pólech a dlouhé v ekvatoriální rovině (Beug 2004). Pylovými zrny, jejich velikostí, tvarem a odlišností od jiných seselů se zabývali Doğan Güner et al. (2011).

Libanotis pyrenaica kvete v červenci až září, v jižnějších zemích už od června.

1.3.2. Ekologie

Libanotis pyrenaica roste na travnatých i křovinatých stráních, v lesních lemech, na skalách, světlínách a svahových sutích. Mezi další stanoviště patří zejména hradní zříceniny, železniční násypy, okraje silnic, kamenolomy a navigace řek. Udávána je též ze slatinných luk (Slavík & Tomšovic 1997), ale žádnou takovou lokalitu jsem nenalezla. Proto se domnívám, že může být ve sterilním stavu občas zaměňována například se žluťuchou *Thalictrum minus* (má listy 3–4× zpeřené, většina lístků je řapíčkatá). Často se také může jednat o zjednodušený popis lokality. Nezřídka bývá na sušších loukách zaměňována s bedrníkem *Pimpinella saxifraga* (ten má ovšem jiné bazální listy, obvykle mnohem méně rýhovanou nafialovělou lodyhu, málokvětá květenství), výjimečně možná i s mladými rostlinami kmínu *Carum carvi*.

Bezesporu se jedná o teplomilný druh, který nesnáší zastínění. Rostlina dokáže v zástínu několik let přežívat, ale nevykveté. Osídluje zejména výslunné jihovýchodní a

západní svahy. Vyskytuje se v nadmořské výšce 150 až 2 000 m (Uhrová 1984), je vápnomilná, nalézá se ale i např. na znělcích, čediči, méně na minerálně chudších půdách, např. žulách, rulách, fylitech (Uhrová 1984), ale snáší i těžké jílovité půdy (Slavík & Tomšovic 1997).

Libanotis pyrenaica vyžaduje podle Ellenbergových indikačních hodnot mírné oslunění (L7), je indiferentní vůči teplotě (Tx), není kontinentálně vyhraněná (K5), je druhem suchých půd (F3), neutrální až zásadité reakce (R8), na extrémně chudých či oligotrofních stanovištích (N2) (www 12).

Libanotis pyrenaica se vyskytuje zejména ve společenstvech svazů *Geranion sanguinei* a *Seslerio-Festucion glaucae*, *Seseli libanotis* - *Asplenietum ruta-murariae*, *Geranio sanguinei* - *Peucedanetum cervariae*, *Coronillo varia* - *Vicetum tenuifoliae* (Slavík & Tomšovic 1997, Reduron 2008).

Jedná se o entomogamní rostlinu, opylovanou dvoukřídlým hmyzem (Diptera) a brouky (Coleoptera) (Slavík & Tomšovic 1997).

1.3.3. Variabilita

Libanotis pyrenaica je variabilní druh, v současnosti nejčastěji členěný na dvě subspecie (např. Heywood & Tutin 1968, Hlavaček et al. 1984, Fischer et al. 2008, Reduron 2008).

Z našeho území je uváděna pouze nominátní subsp. *pyrenaica* (Slavík & Tomšovic 1997) [Syn.: *Seseli libanotis* subsp. *libanotis*, *Libanotis pyrenaica* subsp. *bipinnata* (Čelak.) Holub, *Libanotis montana* subsp. *bipinnata* (Čelak.) Dostál] s čepelí dolních listů 2–3× peřenosečnou, úkrojky podlouhlými až kopinatými, často srpovitě prohnutými, na vrcholu špičatými, rostliny jsou jen 15–50 cm vysoké, obvykle rostoucí na zarostlých skalách, travnatých svazích, lesostepích, v pahorkatinách i na horách (Dostál 1950, Slavík & Tomšovic 1997).

Ze Slovenska byla údajně mylně udávána i subsp. *intermedia* (Rupr.) Soó (Syn.: *Seseli libanotis* subsp. *intermedium* (Rupr.) P. W. Ball) (Dostál 1958). Jedná se o rostliny obvykle se zakrnělými obaly (Dostál 1958), dolními listy s čepelí jednoduše (vzácně 2×) peřenosečnou, úkrojky listů má vejčité, na okraji hrubě zubaté, na vrcholu tupé; rostliny (60–)100–150(–200) cm vysoké. U nás se dle literatury nevyskytuje.

V rámci *L. p.* subsp. *pyrenaica* jsou někdy ještě rozlišovány dvě variety: var. *pyrenaica* a var. *libanotis*. První z nich má listové segmenty hodně dělené do úzkých laloků, lineární,

často jsou 3–5× delší než širší a plus minus zužující se. Druhá by naopak měla mít listové segmenty méně dělené do kopinatých laloků, jen 1–3× delší než širší a nezužující se na bázi (Reduron 2008). Tyto znaky vymezující variety však nejspíš nejsou ustálené.

Celkově lze říci, že rostliny z České republiky dorůstají obvykle větší výšky než udávaných 50 cm (na jižní Moravě exempláře i téměř tři metry), ale obvykle mívají srpovité úkrojky



Obr. 4: Chromozomy *Libanotis pyrenaica* subsp. *intermedium*, $2n = 44$. Převzato z Vitek et al. 1992.

lístků. V rámci populace obvykle s listy 2–3× peřenosečnými (ale jednotlivé rostliny se mohou lišit). Lze se domnívat, že se u nás vyskytuje jak *Libanotis pyrenaica* subsp. *pyrenaica*, tak též subspecie, která od nás udávána nebyla, ale zřejmě se bude o ni jednat – *Libanotis pyrenaica* subsp. *intermedia*. Přičemž diploidní rostliny na našem území nejspíše odpovídají nominální subspecii a v případě tetraploidních rostlin se asi bude jednat spíše o subsp. *intermedia* (viz obr. 4).

Někteří autoři sem řadí i taxon *Seseli sibiricum* (L.) Garcke [*Athamanta sibirica* L., *Seseli libanotis* subsp. *sibiricum* (L.) Thell.; např. Pimenov 1993, She et al. 2005)], jiní autoři ho považují za samostatný druh (Heywood & Tutin 1968, Fröberg 2008). Odlišuje se na základě lysých semen s čnělkou více než do poloviny dvounažky a to v kolmém postavení. Měl by kvést růžově (Reduron 2008), od nás není uváděn.

Libanotis pyrenaica byla popsána jako *Athamanta libanotis* snad dle sběru ze Švédska, *Libanotis pyrenaica* subsp. *intermedia* byla popsána z okolí Petrohradu.

Zatím jsou z literatury udávány jen dvě ploidní úrovně a to diploidní $2n = 2x = 22$ a tetraploidní kde $2n = 4x = 44$ (viz tab. xz). Vzácně jsou uváděni i aneuploidi blízcí diploidnímu cytotypu ($2n = 18, 20$ a 26) (viz dále, Reduron 2008).

1.3.4. Obsahové látky a ekonomický význam

Zástupci čeledi Apiaceae měli v dávné minulosti a mají dodnes pro člověka naprosto nenahraditelný význam – ať se již jedná o zeleninu (např. *Daucus carota*, *Pastinaca sativa*), aromatická koření (*Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Levisticum*

officinale) či léčivé rostliny (*Angelica*, *Pimpinella anisum* (i jako repelent), *Pimpinella saxifraga* – známé pořekadlo “Pijme pivo s bobkem, jezme bedrník, nebudeme stonat nebudeme mřít”, ...) anebo rostliny jedovaté (*Conium maculatum*, *Heracleum mantegazzianum*, *Cicuta virosa* a snad i *Berula erecta*). Asi nejsme daleko od pravdy, když po bok těchto známých druhů zařadíme i poněkud opomíjenou, avšak jistě neméně významnou rostlinu *Libanotis pyrenaica*. Již její stanoviště (hradní zříceniny, pohřebiště, opida) napovídají, že ji lidé v minulosti mohli pěstovat. K jakému účelu se dnes už můžeme spíše dohadovat. Některé prameny ji představují jako bylinu působící proti nadýmání, proti dně (Bonnier 1921), ke snížení tlaku (Ashraf et al. 1979) jiné jako afrodiziakum a další jako zeleninu (mj. Lubomír Hrouda, ústní sdělení). Ať ji lidé dříve skutečně pěstovali, anebo se na oněch stanovištích vyskytla až sekundárně (napodobují biotopy, které vyhledává, viz dále), nelze jí upřít velké množství sekundárních metabolitů (např. různé terpeny, kumaríny, flavonoidy, ...), z nichž některé mohou mít pozitivní vliv na lidské zdraví. *Libanotis* se v Asii a v Turecku používá např. ke konzervování potravin, dále jako zelenina a aromatická přísada např. do bylinných sýrů (Ozturk et al. 2000, Matejic et al. 2012). Bylo by zajímavé podrobit chemickému rozboru oranžovou silně vonící pryskyřičnatou látku, kterou rostlina po poranění obvykle roní. Předpokládám, že by se mělo jednat o antibakteriální látky nebo o jinak významné sloučeniny.

Obsahovými látkami u *Libanotis pyrenaica* se zabývají Ozturk & Sezai Ercisli (2006). Rozborem olejů z tohoto druhu bylo zjištěno, že obsahuje např. karyofyleny a další terpeny a působí tedy velmi antibakteriálně. Nejen *Libanotis pyrenaica*, ale i jiné druhy obsahují látky potlačující růst lidských patogenních mikroorganismů (Matejic et al. 2012). Různé druhy rodu *Seseli* obsahují rozdílné antibakteriální látky působící rozličně na jiné druhy bakterií. Např. *Seseli pallasii* (rostoucí od severu Itálie až po jih České republiky a *Libanotis pyrenaica* (subsp. *pyrenaica* a subsp. *intermedia*) se lišily v účinných látkách i jejich množství a to jak v samotné rostlině tak i v semenech (Matejic et al. 2012). Další chemické rozborů viz Tosun & Özkal 2003, kde lze nalézt také další literaturu k obsahovým látkám u tohoto a příbuzných druhů. V některých státech se rostlina záměrně pěstuje s využitím v parfumerii (Duchesne 1836).

1.3.5. Rozšíření

Libanotis pyrenaica roste roztroušeně téměř po celé pevninské Evropě (viz obr. 6). Na severu zasahuje na jihovýchod Anglie (Sell & Murrell 2009) a do jižní části Skandinávie (Hultén 1950); na západě proniká do Francie (www1); na jih na Apeninský a Balkánský

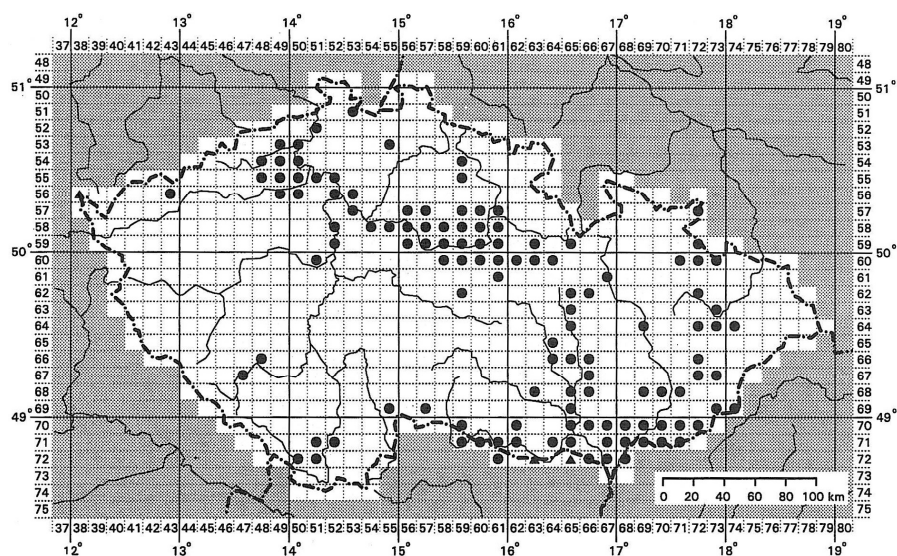
poloostrov. Na východ pokračuje do Karpat (západo-středoevropský taxon, *Libanotis pyrenaica* v úzkém pojetí) nebo až na střední Sibiř (Slavík & Tomšovic 1997), Mongolska (Bobrov et al. 1973) a západní Číny (Peschkova 2006), na základě pojetí jednotlivých taxonů.

1.3.5.1. Rozšíření *Libanotis pyrenaica* v ČR

Rozšířením *Libanotis pyrenaica* v bývalém Československu se ve své diplomové práci podrobně na základě literární rešerše a revize herbářových sbírek zabývala Uhrová (1984), další informace lze nalézt v Květeně ČR (Slavík & Tomšovic 1997), Květeně Horažďovicka (Vaněček 1969) nebo v databázi FLDOKu (www 13).

Obecně se dá říci, že v Čechách klesá frekvence jejího výskytu od východu na západ.

V Čechách se s ní můžeme nejvíce setkat ve východním Polabí (viz obr. 5), hlavně podél Labe od Hradce Králové po Kolín (Uhrová 1984).



Obr. 5: Rozšíření *Libanotis pyrenaica* v České republice (podle Slavík & Tomšovic 1997).

hradní zříceniny je omezena

v jižních Čechách [Sušicko-horažďovické vápence a zříceniny hradů Prácheň, Rábí (Vaněček 1969), hrad Velešín a Českokrumlovské vápence]. Další lokality jsou udávány ze severozápadních Čech, četnost jejího výskytu v Českém středohoří není ovšem v současnosti ověřena [krom Milešovky, odkud mj. pochází většina sběrů uchovávaných v herbáři PRC a růst by měla také u Brně (K. Nepraš, ústní sdělení)]. Ojedinelé výskyty by se měly dle literatury nacházet i v Českém krasu a na území Prahy (např. v Hodkovičkách) (Uhrová 1984). Ze severních Čech jsou zřejmě jen nespolehlivé údaje (Uhrová 1984).

Na Moravě je *Libanotis pyrenaica* výrazně hojnější než v Čechách. Roste v okolí Mohelna, Znojma, Brna, u Tišnova, na Pálavských vrších, v Jihomoravské pahorkatině, Moravském krasu, v Bílých Karpatech. Severněji její výskyt vyznívá - vzácně v povodí

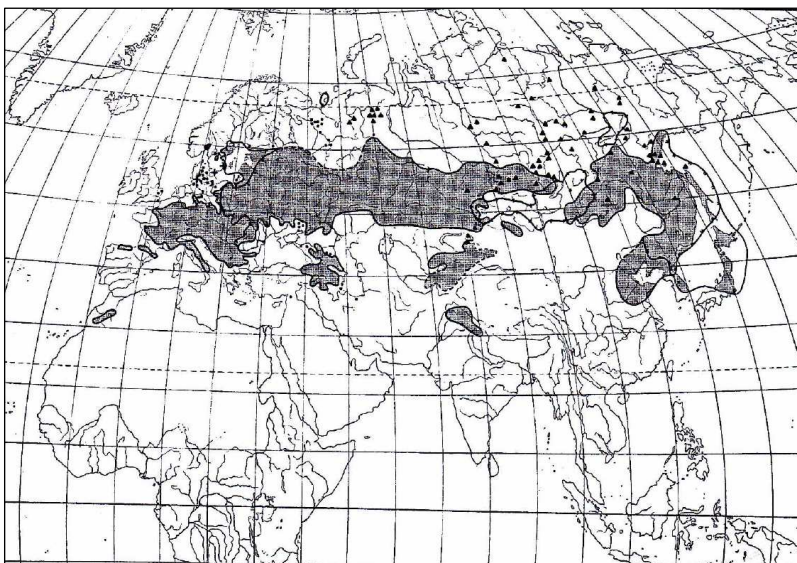
Svratky, v Hornomoravském úvalu, v okolí Olomouce, Štramberka a ve Slezské nížině (Uhrová 1984, Slavík & Tomšovic 1997).

V některých územích se *L. pyrenaica* vyskytuje na víceméně přirozených stanovištích (skály, sutě, lesní lemy či travnaté a křovinaté stráně) nebo naopak na antropicky podmíněných. K takovým patří kamenné navigace řek (např. Labe, Sázava, Ohře), kamenolomy, šterky, násypky a cesty – např. mnohé vlastní sběry (viz tab. 2); šíří se podél kolejí např. mezi Pardubicemi a Hradcem Králové (Slavík & Tomšovic 1997), v minulosti snad i jinde (např. zrušená trať v Rumunsku). Její sekundární výskyt lze předpokládat i v okolí některých hradů a na zříceninách např. hrad Kynšperk nad Ohří, Loket či zřícenina Cvilín v Nízkém Jeseníku (Uhrová 1984).

Podle Slavíka a Tomšovice (1997) je nejvíce druhotných lokalit ve východních Čechách. Za primární výskyt lze na stranu druhou považovat České středohoří, Českokrumlovsko, Moravský kras, Podyjí, Pomoraví, Moravskou bránu a Opavsko (Slavík & Tomšovic 1997).

1.3.5.2. Rozšíření *Libanotis pyrenaica* v dalších zemích

Na Slovensku je výskyt *L. pyrenaica* rovnoměrnější než v Česku, nejspíš díky rozsáhlému zastoupení vápencového a dolomitového podloží. Chybí prakticky jen v části Podunajské nížiny, v Ipeľské pahorkatině, ve Slánských vrších, v části Východních Beskyd a v Potiské nížině (Uhrová, 1984). Vyskytuje se



Obr. 6: Rozšíření *Libanotis montana* ve světě (tmavá kostkovaná plocha).
Převzato z Meusel et al 1978a.

v okolí Bratislavy a v okolí Hlohovce, dále v Malých Karpatech, v části Podunajské nížiny, v Bílých Karpát, Tematínských kopcích, Strážovské hornatině. Více na východ je známá z Kriváňské Malé Fatry, Velké Fatry, Chočských vrchů, Liptovské kotliny, Nízkých Tater, Belanských Tater, Pienin, Muráňské planiny, Slovenského ráje, Spišské kotliny, Braniska a Čerchovského pohorí. Na jihu se s ní setkáváme zejména ve Slovenském krasu (Uhrová 1984,

Hlavaček et al. 1984). Slovenské rostliny řazené do nominální subspecie jsou známy zejména z panonské části – hlavně Burda a Košická kotlina; hojně se nalézají v karpatské oblasti (Hlavaček et al. 1984), zjištěný počet chromozomů je $2n = 22$ (Májovský et al. 1970). Rozšíření druhé subspecie - subsp. *intermedia* není dle literatury dostatečně prozkoumáno – existuje mapa se čtyřmi lokalitami ve Flóře Slovenska (Hlavaček et al. 1984) a zmínka v Dostálově květeně (Dostál 1950) o jejím výskytu v Pieninách, tato poslední lokalita ale byla v následném Klíči dementována (Dostál 1958)]. Chromozomové počty udávány nejsou.

V Rakousku se rozlišuje *Seseli libanotis* subsp. *libanotis* vzrůstem asi do 50 cm a větší *Seseli libanotis* subsp. *intermedium* (Fischer et al. 2008). Nominální subspecie se vyskytuje v montánním, subalpínském i alpínském pásu, od severu na jihozápad (spolkové země Dolní Rakousy, Horní Rakousy, Štýrsko, Korutany, Salcbursko, Tyrolsko) až do italského Jižního Tyrolska (Trentino-Alto Adige); podle autorů rakouského klíče by se mohlo jednat o diploidní cytotyp. *Seseli libanotis* subsp. *intermedium* naopak roste na severovýchodě Rakouska; nejspíš by se mohlo jednat o tetraploida (Fischer et al. 2008), ale do konce 80. let nebyla tato subspecie v Rakousku odlišována (Vitek et al. 1992, Fischer et al. 1994).

O výskytu *Libanotis pyrenaica* v Německu se nejlépe dozvídáme z „Rothmalerových“ klíčů (Rothmaler et al. 1984, 1994, 2007). *Libanotis* se vyskytuje roztroušeně od jihu až do severního Westfálska, Hesenska, Duryňska, Saska-Anhaltska a Vogtlandu. Je častější na jihu země, podél toků, na horách a na severu při pobřeží (Hegi 1927, Schönfelder & Haeupler 1988, Schönfelder & Bresinsky 1990, Benkert et al. 1996 – též mapy). V Německu se vyskytuje jen subsp. *montana* (což by mělo být synonymum se subsp. *pyrenaicum*), kde $2n = 22$ (Rothmaler et al. 1994).

V Polsku roste *Libanotis pyrenaica* roztroušeně po celém území, nejvíce podél toku Visly, v centrální části Polska je spíše vzácnější (mapa viz Zajac & Zajac 2001). V polské flóře (Pawłowski et al. 1960) jsou odlišovány dva druhy, *Libanotis montana* a *Libanotis sibirica*. *Libanotis montana* roste zejména v nížinách v podhůří Sudet, v Tatrách do nadmořské výšky 1 643 m. Druhý druh je rozšířen zejména na východě v údolí Visly, také na horách – v Pieninách. Stejného pojetí se přidržuje i současný polský checklist (Mirek et al. 2002).

Ve Skandinávii a Finsku je *Libanotis pyrenaica* vázána na podloží s vápencem (často šterková nebo promísená s pískem). Ve Švédsku je nejhojnější na jihozápadě země v severním Götalandu a na východě Svealandu, to jest přibližně v oblasti, kde leží Stockholm, Upsala aj. Nalézají se též na přilehlých ostrovech (Öland, Gotland) (Hultén 1950, mapa; Ericsson 2004; Fröberg 2008 – www. 2), ale v její jižní části země chybí (Sternér, 1922). V Norsku je

známa jižně od Osla, ve Finsku na jihovýchodě (Hultén 1950). [Zdejší žebřice mají chlupaté plody, ne lysé, navíc získávají díky variabilitě někteří jedinci narůžovělý odstín okvětních lístků, což připomíná *L. sibiricum*. Ta by se ale měla vyskytovat na Sibiři a některými autory není ani tento taxon odlišován od *Seseli libanotis* (www 2.)]. Ve Finsku se *Libanotis* často vyskytuje na prehistorických obydlích a pohřebištích (Fröberg, L. 2008 – www.2, vč. mapy), což se podobá zvláštnímu stanovišti žebřice pyrenejské na zříceninách v Česku, na Slovensku či v Rakousku. Vyskytuje se též na mnoha lokalitách na jihu Dánska (Sterner 1922, mapa tamtéž),

Ve Velké Británii roste pouze na jihovýchodě země (Meusel et al. 1978a): Sussex, Hertfordshire, Cambridgeshire, Bedfordshire (Sell & Murrell 2009); chromozomové počty jsou $2n = 18$ a $2n = 22$ (Sell & Murrell 2009).

Jiná situace je ve Francii, kde žebřice roste téměř všude; zejména na severu a východě země (Meusel et al. 1978a, www 1). Častá je ve Vogézách a Juře, málo se vyskytuje v Bretani a na pobřeží, velmi vzácná je ve Francouzském středohoří (v Aveyron) a na několika lokalitách v Alpách (Bonnier 1911). Všechny mé sběry pocházejí z širšího Předalpí a všechny rostliny byly diploidní. (viz mapa obr. 7) *Libanotis pyrenaica* var. *libanotis* se vyskytuje v okolí Paříže a v minulosti byla nejspíše vydávána za *Libanotis condensata* (Reduron 2008). Udávané chromozomové počty z francouzské monografie čeledi jsou $2n = (18, 20), 22, (26), 44$ a nebude se zřejmě jednat o chromozomové počty zjištěné pro Francii (Reduron 2008).

Na Pyrenejském poloostrově ji lze nalézt od nížin do 2 000 m n. m., na všech typech substrátu (dle Flora Iberica, www 6); jedná se o rostliny lysé anebo chlupaté, počet chromozomů je $2n = 22$ (www 6.), stejný počet udáván pro Španělsko (Pardo 1981).

Z jižní Evropy *Libanotis pyrenaica* roste v Itálii zejména v Alpách a Apeninách (Pignatti 1982), na Balkánském poloostrově, krom nejj jižnějších částí (Meusel et al. 1978a).

Na území bývalého Sovětského svazu je situace složitější. Literatura rozlišuje druhy *Libanotis intermedia*, *L. setifera*, *L. monstrosa*, *L. dolichostyla*, *L. sibirica*, *L. montana*, *L. buchtormensis*, *L. seseloides*, *L. schrenkiana*, *L. amurensis*, *L. transcaucasica* (Bobrov et al., 1973), z nichž jsou středoevropským rostlinám nejbližší (nebo snad i totožné) *L. intermedia* a *L. sibirica*. *Libanotis intermedia* roste v téměř celé evropské části a na Sibiři; *Libanotis sibirica* roste v jehličnatých a smíšených lesích, na mýtinách a na svazích s vápencovým podloží na středním a jižním Uralu a v Baškirii. Flóra Sibiře rozeznává *Libanotis* jakožto *Seseli libanotis* a žádné nižší úrovně se v knize ohledně zmíněného taxonu nevyskytují (Peschkova 2006). Z Ruska jsou známé diploidní ($2n = 22$) rostliny (např. Peschkova 2006). Z Běloruska je v literatuře uváděn tetraploidní cytotyp

(Semerenko 1985). Na Ukrajině literatura rozlišuje horský (karpatský) druh *Libanotis montana* a spíše nížinný druh *L. intermedia* (Dobročaeva et al. 1987).

V Rumunsku se dle Flóry Rumunska (Săvulescu 1958) rozeznávalo více variet žebřic. V současnosti se ale zde rozlišují jen dva poddruhy a to *Seseli libanotis* ssp. *libanotis*, který se vyskytuje v téměř celé zemi (záznamy chybí jen z regionu Dobrogea) a *Seseli libanotis* ssp. *intermedium* z Bicazké soutěsky, pohoří Mehedinți, Gilau-Muntele Mare, Rodny, Retězatu a z okolí měst Sibiu a Bacău (Oprea 2005).

V Bulharsku se vyskytují zřejmě diploidní rostliny (viz tab. 1), bližší lokality Flóra Bulharska neobsahuje (Jordanov & Kožuharov 1982).

A nakonec ještě zmínka o Turecku. Turecké rostliny dorůstají 150 cm, mají jednoduchou lodyhu s několika postranními větvemi. Rostou v lesích *Picea orientalis*, *Pinus sylvestris* nebo na alpínských loukách a skalnatých plošinách, v nadmořské výšce 10 – 3 000 m n. m. a kvetou od června do srpna. *Libanotis pyrenaica* (*S. libanotis*) roste zejména v severovýchodní části Turecka. Mnoho výskytů přiřknutých tomuto druhu bylo po revizi přehodnoceno k druhu *Seseli transcaucasicum* (Doğan et al. 2013). V současnosti probíhají v Turecku intenzivní studie na tomto a příbuzných druzích.

1.4. Jedinečnost tématu – proč právě studie Libanotis pyrenaica

1) Rozšíření di- a tetraploidů ve střední Evropě podle aktuálních (i když značně neúplných) znalostí (Přívozníková 2013 a nepubl.) „dává smysl“ – oba cytotypy mají určité geografické i ekologické vazby a zjištění geografického patternu cytotypů spolu s uspořádáním genetické variability může významně přispět k poznání hlavních migračních proudů a refugií a obecně florogeneze této oblasti. *Libanotis pyrenaica* představuje do značné míry unikátní ukázkou dynamiky geografického areálu – ten je časově „vícevrstevný“, zahrnující autochtonní populace i v různých časových obdobích (včetně současnosti) vznikající alochtonní populace jako výsledek často rozsáhlých a z hlediska ochrany biotopů potenciálně značně nebezpečných expanzí a invazí. Migrační vlny se přitom v některých územích překrývají, v jiných zůstávají vikariantní. Zcela ojedinělé přetrvávání na hradech a hradních zříceninách (a případně následné šíření do okolí) – spojení biologických (cytometrie, analýza DNA, fytogeografie) a historických přístupů představuje unikátní možnost objasnit vztahy mezi hradními populacemi a význam hradů jako „neorefugií“ často jinak ohrožených a vzácných druhů.

2) Tetraploidní cytotyp se chová značně expanzivně. Snadno se šíří a v současné době roste např. téměř souvisle podél Labe mezi Kolínem a Pardubicemi, mimo naše území je obdobná situace např. v Rakousku podél Dunaje mezi Vídní a Hainburgem a v menší míře i na západním Slovensku v Pováží (tetraploidi rostou pouze podél řeky, nikoliv na sousedních kopcích!) zhruba mezi Povážskou Bystricí a Novým Mestom nad Váhom. Mají přitom všechny předpoklady stát se velmi obtížnou rostlinou, do značné míry měnící druhové složení invadovaných porostů – značná výška (až 270 cm), velká produkce semen a tudíž přísun diaspor do okolí, LAI index, semena zčásti bez dormance (viz kapitola klíčení) a obecně větší schopnost adaptace snad způsobená zdvojením genomu (zatímco diploidi jsou vesměs vázáni na vápnité podklady, tetraploidi rostou v podstatě kdekoli). Poznání aktuálního rozšíření i cenologických vazeb je základním předpokladem pro uvážené rozhodování o případném omezování těchto populací orgány ochrany přírody.

3) *Libanotis pyrenaica* byla pěstována na středověkých hradech (Slavík & Tomšovic 1997) a možná i dříve např. na hradištích (Čulíková 2006). V mnoha případech pak na hradech (dnes spíše na hradních zříceninách) přetrvala do současnosti, zejména díky obohacení půdy vápníkem z malty používané ke stavbě zdí anebo díky menšímu zástínu a nižší konkurenci, než jinde v okolní krajině. Hrady a hradní zříceniny tak představují „neorefugia“ a současně místa, která mohla sloužit jako lokální centra šíření do okolní krajiny.

4) Vnitrodruhové členění *L. pyrenaica* a vztahy k blízce příbuzným druhům (? nebo pouze subspeciím) nejsou zdaleka vyřešené a téměř všechny evropské Květeny, určovací klíče i druhové seznamy připomínají, že „celá problematika vyžaduje další studium“. Důkazem taxonomické neustálenosti i značných nomenklatorických problémů je i to, že v různých recentních dílech se objevuje často zcela odlišné vymezení taxonů a obvykle i zcela odlišná jména.

2. Cíle práce

Hlavním cílem je objasnit vztahy mezi morfológickou variabilitou, genetickou variabilitou, ploidní, ekologickou a geografickou diferenciací u *Libanotis pyrenaica*:

- 1) Objasnit rozšíření jednotlivých cytotypů *Libanotis pyrenaica* ve střední Evropě, zejména na území České republiky a Slovenska a jejich ekologické vazby, případně frekvenci ploidně směsných populací.
- 2) Zjistit fylogeografický pattern v rámci jednotlivých cytotypů (2x, 4x) a mezi nimi, objasnit zda polyploidie vznikali opakovaně a polytopně z různých diploidních linií nebo mají jeden (nebo několik málo) společný původ.
- 3) Objasnit roli hradišť, hradů a hradních zřícenin jako významných „neorefugií“ či z opačného pohledu jako center nežádoucího šíření invazního druhu.
- 4) Srovnat klíčivost diploidních a tetraploidních diaspor v laboratorních podmínkách (klimaboxy).
- 5) Srovnat plovatelnost diploidních a tetraploidních diaspor s ohledem na aktuální šíření zejména tetraploidního cytotypu podél řek.
- 6) Doplnkově vyhodnotit vybrané morfológické znaky u diploidů a tetraploidů.

3. Cytogeografie a genetická diversita

3.1. Úvod

3.1.1. Ploidní variabilita na vnitrodruhové úrovni

Ačkoliv jsou morfologicky a taxonomicky vymezené druhy se zastoupením dvou i více ploidních úrovní známe už dlouhou dobu, soustavnější pozornosti se jim dostalo až s nástupem průtokové cytometrie, metody umožňující levné a rychlé stanovení ploidie u rozsáhlých populačních vzorků, a tudíž odhalení prostorového patternu ploidní diversity.

Obecně je možné rozlišit tři případy cytotypově rozdílných populací: 1) populace různých ploidí jsou výrazně prostorově oddělené (vikariantní), 2) populace různých ploidí jsou sice prostorově oddělené (nejedná se o smíšené populace), ale pouze na malé škále (parapatrie) a 3) populace sestávají z rostlin dvou i více různých ploidí – koexistence ploidí pak může být buď pouze dočasná [minority cytotype exclusion (Levin 1975, Husband 2000)] nebo více či méně stabilní, umožněná vytvořením pre- nebo postzygotických reprodukčních bariér mezi cytotypy (méně častá je koexistence u volně se křížících cytotypů). Studium ploidně smíšených druhů má obecně zásadní význam nejen pro poznání mikroevolučních procesů (pro to jsou ploidně smíšené populace zcela ideální), ale i pro objasnění florogeneze na různých prostorových škálách.

V České republice a sousedních zemích již bylo nalezeno větší množství ploidně diferencovaných druhů, např. *Gymnadenia conopsea* (Trávníček et al. 2011b), *Vicia cracca* (Trávníček et al. 2010), *Pilosella echinoides* (Trávníček et al. 2011), *Pilosella officinarum* (Mráz et al. 2008), *Campanula patula* (např. Laane et al. 1983), *C. rotundifolia* (Kovanda 1977), *C. moravica* (Šemberová 2013), *Centaurea stoebe* (Španiel et al. 2008). Obecně asi nejznámějšími modelovými skupinami pro studium cytotypových interakcí jsou pak *Epilobium* (*Chamerion*) *angustifolium* (Husband & Schemske, 1998) a *Senecio carniolicus* (Suda et al. 2007, Sonnleitner et al. 2010). Prostorovou heterogenitu prostředí může dobře odrážet různá distribuce cytotypů (Otto & Whitton 2000, Hanzl 2010). Někdy je dobře zřejmé, jindy se musí hledat v jiném prostorovém měřítku a také se může jednat o pozůstatek z dřívějších podmínek, na jejichž změnu ještě nestihly zareagovat.

Příkladem takto segregovaných ploidí mohou být cytotypy chrpy *Centaurea stoebe* (Asteraceae), kde se tetraploidi vyskytují na antropogenně disturbovaných místech (např. lomy, okraje cest) na rozdíl od diploidů, kteří rostou i v zapojených suchých trávnících (Mráz

et al. 2011). Tetraploid srhy *Dactylis glomerata* (Poaceae) roste v antropicky narušených trávnících - na rozdíl od stinomilnějšího diploida vyskytujícího se v doubravách (Lumaret et al. 1987). Taktéž diploidní *Deschampsia cespitosa* (Poaceae) se vyskytuje spíše ve starších přirozených lesích, na rozdíl od tetraploidních, které jsou rozšířeny na loukách, pastvinách, plantážích a často při krajnicích (Rothera & Davy 1986).

Vliv na výsledné rozšíření jednotlivých ploidí mohou mít i rozdíly ve fyziologii a cytotypů – např. tetraploid zlatobýlu *Solidago gigantea* (Asteraceae) je na rozdíl od diploidního cytotypu tolerantní k vápníku (Schlaepfer et al. 2010).

Kromě chemických vlastností okolí se ale polyploidi mohou od svých diploidních příbuzných odlišovat například v závislosti na teplotě.

Schopnost cytotypu vyklíčit v nižších teplotách by mohl rostlině dát více času pro samotný růst, případně dojít dříve do fáze kvetení. Na druhou stranu pokud by semeno vyklíčilo příliš brzy např. na horách hrozil by mu extrémní stres nebo dokonce předčasné zkonání... Rozdíly se mohou nacházet i v jiném rostlinném zastoupení v biotopu u jednotlivých cytotypů, jak tomu bylo zjištěno např. u diploidů *Galax urceolata* (Diapensiaceae), kteří se nacházeli ve větším zápoji keřů a stromů, zatímco tetraploidi v oblastech s bohatým bylinným patrem (Johnson et al. 2003). Zároveň ale samozřejmě existují studie, které naznačují, že mezi některými cytotypy rozdíly v jejich biotopech nejsou (např. *Solidago altissima*, Halverson et al. 2008).

Srovnáme-li zastoupení ploidně diferencovaných druhů napříč čeleděmi, zůstane na jednom z posledních míst čeleď Apiaceae, kde jsou obecně polyploidní druhy spíše vzácností. Z druhů zastoupených v naší květeně byla zkoumána *Pimpinella saxifraga* (Mozolová 2007), kde se vyskytují diploidi, tetraploidi a snad i triploidi ve smíšených populacích. Diploidní a tetraploidní cytotyp se dá odlišit na základě velikosti pylu, délky tyčinky a velikosti korunních lístků. Velmi malá pozornost byla naopak věnována dalšímu druhu *Libanotis pyrenaica*, u kterého byla sice ploidní diferenciace známá, podrobnější údaje o četnosti, morfologii, rozšíření a ekologických vazbách jednotlivých ploidí ale chyběly.

3.1.2. Ploidní variabilita u *Libanotis pyrenaica*

U druhu *Libanotis pyrenaica* byl doposud zjištěn diploidní ($2n = 22$) a tetraploidní ($2n = 44$) cytotyp a vzácně i aneuploidní rostliny (tab. 1). Diploidní cytotyp je zřejmě rozšířen po celém areálu druhu, tetraploidní byl zjištěn jen v ČR, Rakousku a Bělorusku (viz přehled chromozomových počtů a citace v tab. 1).

V České republice byly zjištěny diploidní i tetraploidní jedinci *Libanotis pyrenaica*, ale přesnější rozšíření obou cytotypů nebylo do současnosti známo. Diploidi byli ověřeni z vápencových ostrůvků v jižních a jihozápadních Čechách (Sušicko-horažďovické vápence a Českokrumlovsko), tetraploidi ve středním a východním Polabí a na jižní Moravě. Počet zkoumaných rostlin byl doposud velmi malý (Slavík & Tomšovic 1997). Nedalo se tedy zatím říct, zda se u nás vyskytuje kontaktní zóna (zóny) a vznikají ploidně smíšené populace. Kontaktní zóna by byla zajímavá s ohledem na možné křížení diploidů a tetraploidů a vznik triploidních rostlin – ty jsou zatím uváděny jen ze Slovenska, viz Slavík & Tomšovic (1997).

O evoluční a migrační historii obou ploidí se tudíž nedalo říci téměř nic. Naskytovalo se několik možností, například by bylo možné, že by diploid byl u nás původní a tetraploid se šířil až v novější době (tetraploidi jsou obecně považováni za invazivnější cytotyp, viz Schlaepfer et al. 2010) např. podél řek (Polabí) nebo silnic a železnic. Navíc jsou známy výskyty na hradních zříceninách (viz 3.4.), které mohou být pozůstatkem pěstování, ale i výsledkem dálkového šíření. Nabízela se možnost, že by tetraploidní populace vznikla třeba na jihu Moravy, kde by postupně vytlačila původní diploidní cytotyp a sama se pak začala šířit, to ale nelze bez znalosti ploidní struktury v sousedních zemích tvrdit ani vyvracet; Sušicko-horažďovické vápence na jihu Čech a Český Krumlov s okolím by pak hostily původní diploidní cytotyp, k němuž se tetraploid zatím neměl možnost dostat.

Tab. 1. Publikované počty chromozomů u *Libanotis pyrenaica*. Převzato z Přívozníková 2013, upraveno.

Uváděné jméno	Lokalita	Ploidie a počet chromozomů	Citace	Známo z
<i>Seseli libanotis</i>		n=9	Gardé & Gardé, Silvestre 1949 (n. v., podle www.3)	www 3. (databáze)
<i>Seseli libanotis</i>		2n=18	Gardé & Gardé, Silvestre 1949 (n. v., podle www.3)	www 3. (databáze)
<i>Seseli libanotis</i>		2n=18	www 2 (Fröberg 2008)	
<i>Seseli libanotis</i> var. <i>leiocarpa</i>	Bulharsko, centrální Stara Planina: otevřená skalnatá místa pod vrchem Šipka	2n=20	Markova & Robeva 1972	
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	Španělsko: Huesca, Broto	n=11	Silvestre 1978	
<i>Seseli libanotis</i>	Francie, Pyreneje: Laurenti	n=11	Cauwet 1968	
<i>Seseli libanotis</i>	Francie, Pyreneje: Escoutou	n=11	Cauwet 1968	
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	Rakousko, Korutany: Nockberge, Turracher Höhe	n=11	Wetschnig & Leute 1991	
<i>Seseli libanotis</i>	Turecko, v. Anatolie, Erzurum	n=11	Pimenov et al. 1996	
<i>Libanotis intermedia</i>	Rusko, Hornoaltajská oblast: Ongudaj	n=11	Rostovtseva 1976	
<i>Libanotis intermedia</i>	Rusko, Hornoaltajská oblast: Čemal	n=11	Rostovtseva 1976	
<i>Libanotis intermedia</i>	Rusko, Chakaská republika: Krasnaja Sopka	n=11	Rostovtseva 1976	

Uváděné jméno	Lokalita	Ploidie a počet chromozomů	Citace	Známo z
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>intermedia</i>	7 rostlin, všechny z botanických zahrad	2n=22	Constance et al. 1976	
<i>Seseli libanotis</i>	Francie, Pyreneje: Vallée d'Eyne (3 různé lokality)	2n=22	Cauwet 1968	
<i>Seseli libanotis</i>	Francie, Pyreneje: Cambre d'Aze	2n=22	Cauwet 1968	
<i>Seseli libanotis</i>	Francie, Pyreneje: Péric	2n=22	Cauwet 1968	
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	Rakousko, Korutany: St. Veit an der Glan	2n=22	Wetschnig & Leute 1991	
<i>Libanotis pyrenaica</i>	Česká republika: Českokrumlovské Předšumaví, Sušicko-Horažďovické vápence	2n=22	Slavík & Tomšovic 1997	
<i>Libanotis montana</i>	Polsko: Ojców, údolí Kobylańska	2n=22	Pogan et al. 1982	
<i>Libanotis montana</i>		2n=(18, 20), 22, (26), 44	Pimenov et al. 2003 (n. v., podle Reduron 2007)	Reduron 2007
<i>Libanotis pyrenaica</i>	Slovensko, Bratislava: Devínská Kobyla	2n=22	Murín & Uhríková in Májovský et al. 1970	
<i>Seseli libanotis</i> var. <i>leiocarpa</i>	Bulharsko, Vitosha: otevřená skalnatá místa Kopitota	2n=22	Markova & Robeva 1972	
<i>Libanotis montana</i> var. <i>montana</i>	Bulharsko, region Znepole: Vápencové skály blízko Banja.	2n=22	Peev & Andreev 1978	
<i>Libanotis intermedia</i>	Rusko, Novosibirska oblast: Akademgorodok (okolí)	2n=22	Rostovtseva 1982	
<i>Seseli libanotis</i>		2n=22	Heywood & Tutin 1968	
<i>Seseli libanotis</i> var. <i>pyrenaicum</i>		2n=22	Pardo 1981	
<i>Libanotis montana</i>	Polsko: Ojców, údolí Kobylańska	2n=22	Pogan et al. 1982	
<i>Libanotis montana</i>	Polsko: Ojców, údolí Będkowska	2n=22	Pogan et al. 1982	
<i>Libanotis intermedia</i>		2n=22	Rostovtseva 1984*	Goldblatt & Johnson 2003 (www 8)
<i>Seseli libanotis</i>		2n=22	Retina 1985*	Goldblatt & Johnson 2003 (www 8)
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>libanotis</i>	Rakousko, Korutany: St. Veit an der Glan	2n=22	Wetschnig & Leute 1991	
<i>Libanotis pyrenaica</i> (subsp. <i>montana</i>)		2n=22	Rothmaler et al. 1994	
<i>Seseli libanotis</i>		2n=22	Alexeeva et al 1994	
<i>Seseli libanotis</i>		2n=22	Peschkova 2006	
<i>Seseli libanotis</i>		2n=22	www 2 (Fröberg 2008)	
<i>Seseli libanotis</i>		2n=22	www 6. (Flora Iberica)	
<i>Libanotis pyrenaica</i>	Česká republika, Sedlec, 48°47'9.667"N, 16°42'17.158"E	2n=22	Schwarzová 2012	
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>intermedium</i>	Rakousko, Dolní Rakousy: Bad Deutsch Altenburg, u nádraží	2n=44	Vitek et al. 1992	

Uváděné jméno	Lokalita	Ploidie a počet chromozomů	Citace	Známo z
<i>Seseli libanotis</i> subsp. <i>maius</i>	Česká republika, Mutěnická pahorkatin: 200 m jižně od nádraží Čejč	2n=44	Dvořák & Dadáková 1977	
<i>Libanotis pyrenaica</i>	Česká republika: Střední Polabí, Východní Polabí, Dunajovické kopce, Dolnomoravský úval, Jihomoravská pahorkatina	2n=44	Slavík & Tomšovic 1997	
<i>Libanotis pyrenaica</i>	Česká republika, botanická zahrada MU	2n=44	Schwarzová 2012	
<i>Seseli libanotis</i>		2n=44	Dvořák 1979*	Databáze (www 10)
<i>Seseli libanotis</i>	Bělorusko, oblast Minska, Puchovičský okres	2n=44	Semerenco 1985	

3. 2. Materiál a metodika

3.2.1. Rostlinný materiál

Nejprve bylo nutné na základě literární rešerše vytipovat vhodné oblasti výskytu druhu (Slavík & Tomšovic 1997; Florabase – www 13; atp.). Rostliny jsem sbírala v letech 2012–2016 na 110 lokalitách v České republice, na Slovensku, v Rakousku, Německu, Francii, Polsku, Rumunsku a Maďarsku; zároveň jsem získala rostliny z dalších zemí – Norska, Chorvatska a Ukrajiny, celkový počet lokalit byl tak 137 (Tab. 2). Cílem bylo reprezentativně pokrýt území ČR a Slovenska (obě ploidie, zastoupení různých typů stanovišť), dále byla snaha získat rostliny ze sousedních území a území zajímavých z hlediska možných migračních proudů. Obvykle jsem brala 10 rostlin z populace (pokud to její velikost dovozovala), ze kterých byla část oddělena a použita následně pro cytometrické analýzy; rostliny byly následně herbarizovány (sběry jsou uloženy v herbáři PRC). V několika případech jsem cytometrovala vysušený materiál ze silikagelu. Z pěti rostlin (z celkových deseti) jsem odebrala část listové čepele do čajových sáčků, které jsem vysoušela silikagelem. S ohledem na finanční možnosti byla pro molekulární analýzy použita pouze jedna rostlina na populaci.

3.2.2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, zkratka FCM) je cytogenetická metoda (Doležel et al. 2007a) umožňující na základě tzv. hydrodynamické fokusace (seřazení částic za sebou po jedné) a ozáření obarvených částic stanovit relativní (např. za použití barviva DAPI) nebo absolutní (PI) velikost genomu. Unášecí kapalina (za níž obvykle slouží destilovaná voda nebo roztok solí) je hnána do relativně široké průtokové komůrky pod větším tlakem, než samotná suspenze měřených částic, čímž dochází k jejich uspořádanosti a následně procházejí

paprskem excitačního záření (Suda 2011) v současnosti nejčastěji vyzařovaného lasery nebo diodami. Po excitaci se barvivo vrací do původního energetického stavu za vyzáření světla o vyšší vlnové délce, a tepla. Fluorescence je zachycena optickou soustavou – filtry a zrcadly – a následně převáděna za pomoci fotonásobičů a zesilovačů na elektronický signál, jenž je zpracováván počítačem (Suda 2011).

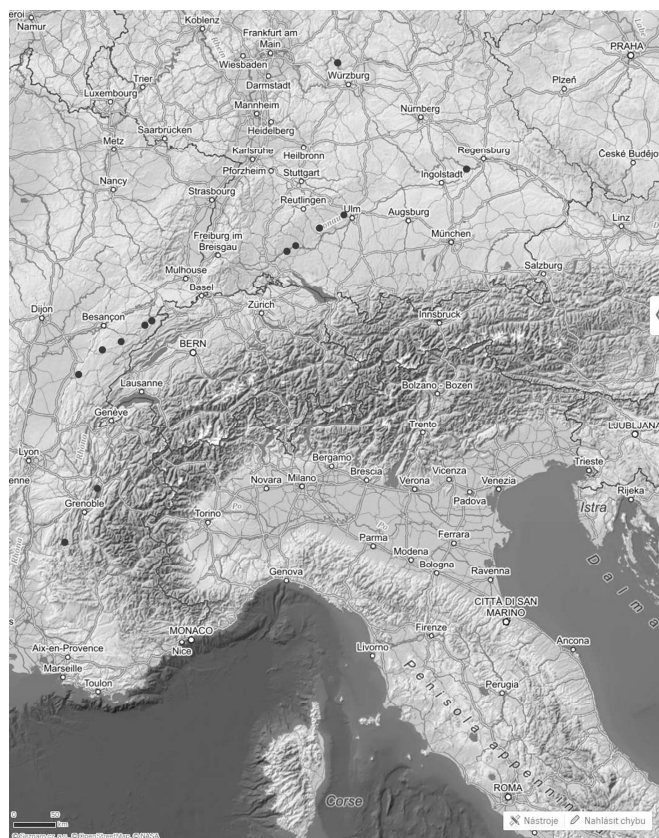
Mezi přednosti průtokové cytometrie patří cenová dostupnost, jednoduchá a rychlá příprava vzorků i následné analýzy a nedestruktivnost – na analýzu stačí malý kousek rostlinného pletiva (Suda 2011). To mimo jiné umožnilo rozpoznávání cytotypů semenáčků či chráněných rostlin (Loureiro et al. 2010). Často se využívá také na určení ploidie semen či jejich rodičů. Na stranu druhou má i FCM svá omezení. Problém může nastat při měření příliš mladých pletiv (hodně jader se nachází v G2 nebo S fázi), rostlin s CAM metabolismem, nebo u vzorků s vysokým obsahem slizových látek či sekundárních metabolitů (např. taninů, viz Loureiro et al. 2006) v pletivech, které negativně ovlivňují vazbu fluorescenčních barviv na dvoušroubovici DNA (Suda 2011).

Obsah DNA v jádře se vyjadřuje v pikogramech (pg) nebo megapárech bází (1 pg odpovídá 978 Mbp) a označuje se jako velikost genomu (Suda 2011). Holoploidní velikost genomu (Greilhuber et al. 2005) je množství jaderné DNA nereplikované gametické buňky (C-value), množství jaderné DNA monoploidní sady chromozomů se označuje Cx-value (Suda 2011). C-value a Cx-value bývají u diploidů stejné (Greilhuber et al. 2005), u polyploidů je ale C-value větší. (Cx se získá jako podíl 2C-value a stupně ploidie.) (Suda 2011).

Pomocí této C-hodnoty lze označit genom buňky za haploidní (1C) nebo diploidní (2C). 1Cx naopak představuje průměrnou velikost jedné monoploidní chromozomové sádky, 2Cx vyjadřuje obsah DNA v nereplikovaném jádře somatické buňky diploidního organismu (Greilhuber et al. 2005, Suda 2011). Velikost genomu nám pomáhá odhalovat polyploidy a hybridy, umožňuje bližší poznání molekulární biologie, souvisí s ekologickými, fenologickými či morfologickými podmínkami.

DNA ploidii jsem stanovila pomocí průtokového cytometru za použití barviva DAPI (Doležel et al.

2007b). Analyzovala jsem čerstvý materiál (listovou čepel, výjimečně řapíky) obvykle ve směsných vzorcích maximálně po třech jedincích. Za standard posloužila *Bellis perennis* (kde $2C = 3,38$ pg; Schönswetter et al. 2007). Výjimečně bylo za standard použito *Solanum pseudocapsicum* ($2C = 2,61$ pg). V Cytometrické laboratoři UK jsem postupovala standardním dvoukrokovým postupem (Doležal et al. 2007b). Žiletkou jsem rozsekala asi $0,5\text{ cm}^2$ čerstvého listu (nebo o něco víc sušeného ze silikagelu) na Petriho misce spolu s adekvátně velkou částí interního standardu, v tomto případě *Bellis perennis*, v 0,5 ml vychlazeném pufru Otto I. (0,1 M monohydrát kyseliny citrónové, 0,5 % Tween 20; Otto 1990). Suspenze se přefiltruje (filtr s průměrem ok $42\text{ }\mu\text{m}$) do kyvety, přidá se fluorescenční barvivo (DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenylindol nebo PI) rozpuštěné v pufru Otto II. (0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; Otto 1990) spolu s β -merkaptethanolem (u PI ještě s RNAázou), nechá se cca 3 min inkubovat a vloží se do cytometru. Používala jsem cytometr Partec ML od firmy Partec GmbH. Výsledné histogramy byly zpracovány programem Partec FloMax. Absolutní velikost genomu byla detekována pomocí barviva PI na průtokovém cytometru, vždy pro jednu rostlinu z populace, na 5 000 jader. Pro zjištění relativní velikosti genomu a DNA ploidie se analyzovalo jen 3 000 jader, obvykle ve směsných vzorcích.



Obr. 7: Mapa vlastních sběrů ve Francii a Německu. Jednalo se výhradně o diploidní cytotyp (černé puntíky).

CV udává přesnost měření. Obvykle je žádoucí, aby bylo do 3,5 u vzorku i standardu, u problematictějších rostlin se ale berou za dostatečná i měření s CV 5. *Libanotis pyrenaica* obvykle funguje na cytometru dobře, přesto jsem měla velké množství analýz, u nichž je CV hodně vysoké (vlivem měření starší a špatně uchované rostliny např. po déle trvajícím terénu, měření ze silikagelu nebo špatně seřízený cytometr).

Bylo-li CV vzorku nebo standardu vyšší než 4, použila jsem výsledné analýzy jen k vyhodnocení ploidní úrovně populace, ale nezahrnula jsem je do výsledné tabulky velikosti relativní a absolutní velikosti genomu. Do výsledné tabulky tak bylo zahrnuto jen 417 analýz pro relativní velikost genomu a pro absolutní velikost genomu 119 analýz.

Tab. 2: Lokality sběrů s GPS souřadnicemi a ploidii. Pokud byly lokality použity také pro molekulární analýzy, odkazuje na tuto skutečnost sloupeček cp1, cp2, cp1+2. Čísla ve sloupečku cp1, cp2, cp1+2 označují haplotyp daného vzorku. Je shodný s haplotypy v TCS síti a stromečkách dle cp. Vysvětlivky zkratk: Země: BH - Bosna a Hercegovina, ČR - Česká republika, D - Německo, F - Francie, Ch - Chorvatsko, Ma - Maďarsko, No - Norsko, Po - Polsko, Ra - Rakousko, Ru - Rumunsko, Sl - Slovinsko, SR - Slovensko, SRB - Srbsko, Uk - Ukrajina. Ploidie - 2x je diploidní cytotyp, 4x tetraploidní cytotyp. ! značí, že byly zaznamenány rostliny s různě velkým genomem (snad aneuploidie). Zkratky sběratelů (v ostatních případech vlastní sběry): FK - Filip Kolář, FKr - František Krahulec, JCH - Jindřich Chrtěk, LN - Lukáš Němeček, MH - Martin Hanzl-Čertner, PM - Patrik Mráz, RB - Romana Bartošová.

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
BH	4x		Bugojno	skály nad silnicí Bugojno-Kupres, 5 km Z od vápencového skalního města a údolního aluvia, FK	N42 44 02.555 E17 22 26.796	772,7 m	35	13	41
ČR	4x	střední Polabí	Ostrá	okraj PR Mydlovarského luhu, na labské navigaci mezi cestou a lesem	N50 10.036 E14 54.524; N50 10.099 E14 54.435	185 m			
ČR	2x !	Blanský les	Český Krumlov	Český Krumlov, třída Míru, krátký svah mezi chodníkem a parcelou č. 798/6	N48 49.037 E14 18.862	515 m	21	11	20
ČR	?	Železné hory	Chrast / Skála	úpatí opukové skály přecházející v suť pod obcí Skála; asi 200 m s. od kostela v Podskále; stejnomenná rezervace	N49 52.187 E15 56.817	324 m			
ČR	4x	Železné hory	Skuteč	samota „Mikšův les“, před býv. drtírnou kamene; mezi Prosetínem a Skutčí	N49 50.213 E15 58.352	399 m	22	10	23
ČR	4x	Svitavská pahorkatina	Dlouhá Loučka	rezervace "Dlouholoučské stráně"; 100 m sv. od čp. 192	N49 42.413 E16 38.631	430 m	20	19	19
ČR	4x	Nízký Jeseník	Krnov	ruiny hradu Cvilín	N50 04.149 E17 43.667	419 m	1	3	1
ČR	2x !	Moravskoslezské beskydy	Štramberk	vrcholové skalky nad jeskyní Šipka ve stejnomenné rezervaci u pomníku B. Smetany	N49 35.133 E18 07.060	497 m	11	20	13
ČR	2x	Moravskoslezské beskydy	Starý Jičín	ruiny hradu Starý Jičín	N49 34.984 E17 57.808	469 m	4	4	4
ČR	4x	Bílé Karpaty	Radějov	vrch Žerotín 322 m z. od Radějova; okraj stejnomenná rezervace; asi 50 m v. od kaple. Dříve zde stávala vojenská hláska v rámci obraného systému Strážnice.	N48 51.789 E17 19.648	313 m	19	6	18
ČR	2x	Česká Kanada	Landštejn	nádvoří hradu podél zdí	N49 01.428 E15 13.872	655 m	1	9	

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
ČR	2x	NP Podyjí	Čížov	osamocené 2 rostliny na hřebeni „Ledové sluje“	N48 53.031 E15 50.608	419 m	29	1	32
ČR	2x	NP Podyjí	Lukov	zdivo vstupního koridoru na zřícenině „Nový Hrádek“ u Lukova	N48 50.281 E15 54.397	362 m			
ČR	2x	Znojensko	Plaveč	zřícenina hrádku Lapikus	N48 56.217 E16 03.159	290 m	27	26	30
ČR	2x !	NP Podyjí	Hnanice	svah a neobdělané pole na kraji lesa	N48 48.063 E15 58.240	311 m			
ČR	2x	NP Podyjí	Hnanice; katastrálně Podmolí	podél cesty skrz vinici Šobes	N48 48.935 E15 58.551	280 m			
ČR	4x	Pálava	Dolní Dunajovice	Liščí kopec na okraji rezervace „Dunajovické kopce“	N48 50.259 E16 34.214	245 m			
ČR	4x	Pálava	Sedlec	PP Skalky u Sedlece	N48 46.780 E16 40.293	191 m			
ČR	2x !	Pálava	Horní Věstonice	pod zříceninou Nový hrad	N48 51.941 E16 38.041	360 m			
ČR	4x	Pálava	Pouzďřany	okraj rezervace Pouzďřanská step	N48 56.332 E16 38.674	209 m			
ČR	2x	České středohoří	Milešov	světlna na jzz. svahu Milešovky na modré tur. značce	N50 33.276 E13 55.794	777 m	11	20	13
ČR	2x	Pošumaví - Bavorovská pahorkatina	Rábí	ruiny hradu Rábí	N49 16.721 E13 37.107	471 m	7	3	22
ČR	2x	Kaplická brázda	Velešín	ruiny hradu Velešín	N48 49.926 E14 28.757	496 m			
ČR	4x	Chřiby	Koryčany	ruiny hradu Cimburk	N49 06.213 E17 12.943	433 m	22	10	23
ČR	4x	Hostýnské vrchy	Lukov	ruiny hradu Lukov	N49 18.192 E17 44.384	511 m	24	33	25
ČR	2x	Moravský kras	Sloup	skály asi 100 m SV od skály Hřebenáč	N49 24.659 E16 44.350	475 m	7	18	39
ČR	2x	Moravský kras	Sloup	louka asi 50 m J od skály Hřebenáč	N49 24.583 E16 44.273	473 m			
ČR	2x	Moravský kras	Holštejn	ruiny hradu, Holštejn - okraj skalní hrany	N49 24.117 E16 46.578	503 m	20	19	19
ČR	4x	Pardubický kraj, okres Pardubice	Ráby, Kunětická hora	třešňovka u parkoviště na z. úbočí vrchu, sad (třešňovka), mezofilní ovsíkový trávník, JCH	N50 04 00 E50 51 00	255m	32	10	35

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
ČR	4x	Pardubický kraj, okres Pardubice	Řečany nad Labem, levý břeh Labe 10 m Z od mostu	680 m S od obce (od kostela sv. Marie Magdalény); říční navigace, břeh Labe, mezofilní trávník, JCH	N50 01 60 E40 47 16	206 m	22 - 4 rostliny (tytéž na cp2), (26 - 1 rostlina)	14	43
ČR	4x	Středočeský kraj, okres Kolín	Kolín, Zálabí	po levé straně silnice do Tří Dvůrů asi 100 m od posledních domů; silniční příkop, JCH	N50 01 58.88 E15 13 55	197 m	11	27	42
ČR	4x	Středočeský kraj, okres Kutná Hora	Záboří nad Labem	motokrosový areál na SZ okraji obce, 200 m SSV od nádražní budovy; JCH	N50 01 12 E15 20 59	206 m	22	10	23
ČR	4x	Východní Polabí	Semín	pod skupinou stromů na západním okraji rezervace Semínský přesyp (východní část), JCH	N50 03 20 E15 31 17	215 m	14		
ČR	4x	Východní Polabí	Chvaletice	podél trati 100 m východně od zastávky Chvaletice, JCH	N50 02 14 E15 25 12	205 m	15		
ČR	2x	Vyšenské kopce	Nové Dobrušky	zarůstající louka na jihovýchodním svahu vrchu Nad Mlýnem (615 m), JCH	N48 49 15 E14 17 30	540 m	21	11	
ČR	2x	Vyšenské kopce	Český Krumlov	podél trati (severně od ní) 1 km S od zámku, JCH	N48 49 08 E14 18 19	530 m			
ČR	4x	Pardubický kraj, okres Pardubice	Holice	Poběžovice u Holic, MH					
ČR	4x	Bílé Karpaty	Javorník	lem cesty na severozápadním úpatí Machové (blízko podjezdu pod tratí), JCH	N48 49 46 E17 31 11		20	19	19
ČR	4x	Polabí	Přelouč Lohenice	příkop silnice na V okraji obce , ca 210 m n. m., MH	N50 02 41.051 E15 36 06				
ČR	4x	Bílé Karpaty	Čertoryje	JCH					
ČR	4x	Východní Polabí	Přelouč	zarůstající louka u červeně značené turistické cesty 1,4 severně od kostela sv. Jakuba, JCH	N50 38 08 E15 33 34	210 m	34		
D	2x	Fränkische Alb / Francká Jura	Kelheim	vápencové skalky v kaňonu na levém břehu Dunaje	N48 54.338 E11 50.875 (N48 54.922 E11 51.252)	340 m (335 m)	7	6	12

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
D	2x	Schwäbische Alb / Švábská Alba	Blaustein	úpatí skal Tagsteinfelsen u silnice na okraji obce	N48 25.060 E9 54.170	492 m			
D	2x	Schwäbische Alb / Švábská Alba	Hayingen	příkop vedle silnice pod lesem v údolí mezi Hayingenem a zříceninou Schloss Ehrenfels	N48 15.991 E9 27.888	603 m	8	3	9
D	2x	Schwäbische Alb / Švábská Alba	Anhausen	skalky na ostrohu pod zříceninou Maisenburg	N48 17.129 E9 29.984	626 m	11,12	31	36
D	2x	Schwäbische Alb / Švábská Alba	Gutenstein	příkop vedle silnice pod skálami	N48 04.844 E9 06.730	586 m	9	3	10
D	2x	Schwäbische Alb / Švábská Alba	Beuron	vyhlídka Knopfmacherfelsen	N48 01.778 E8 57.142	755 m			
D	2x	Schwäbische Alb / Švábská Alba	Fridingen	území mezi vyhlídkou Laibfelsen(1) a parkovištěm ve vsi (2)	N48 00.882 E8 56.440 (N48 01.140 E8 56.193)	715 m (674 m)			
D	2x	Mainfränkische Platten/ Mohansko-franské plošiny	Karlstadt	severozápadně orientovaná hrana údolíčka ústícího do kaňonu Mainu; 2,5 km ssv. od hlavního kostela St. Andreas v Karlstadu	N49 59.031 E9 46.385	248 m		2	
D	2x	Tüchersfeld	Pottenstein	vápencové skály ve vesnici Tüchersfeld, FK	N49 47 11.378 E11 21 35.154				
Fr	2x	francouzská Jura (Alpy)	Fleurey	vápencový lom u silnice na levém břehu říčky Le Dessoubre	N47 17.011 E6 45.891	389 m		3	
Fr	2x	francouzská Jura (Alpy)	Rosureux	svažité trávníky u silnice asi 1 km záp. od obce Rosureux	N47 13.043 E6 40.167	527 m	10	3	11
Fr	2x	francouzská Jura (Alpy)	Mouthier-Haute-Pierre	skalky při silnici mezi obcemi Haute-pierre-le-Châtelet a Mouthier-Haute-Pierre	N47 02.677 E6 16.174	562 m			
Fr	2x	francouzská Jura (Alpy)	Crouzet-Migette	vápencové skály u mostu Pont du Diable mezi obcemi Crouzet-Migette a Sainte-Anne	N46 56.970 E5 59.885	586 m	2	22	2

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
Fr	2x	francouzská Jura (Alpy)	Baume-les-Messieurs	lučinatý svah v cirku pod jeskyní "Grottes de Baume" nad pěnovečným vodopádem	N46 41.429 E5 38.313	400 m	23	21	27
Fr	2x	Massif de la Chartreuse (Alpy)	Entremont-le-Vieux	severozápadní svah sedla "Col de l'Alpette" mezi horami "Le Pinet" a "Mont Granier"	N45 26.513 E5 55.123	1535 m			
Fr	2x	Vercors (Alpy)	Chamaloc	okolí východního portálu tunelu, 1 km jv od vrcholu But de Neve (1656 m)	N44 50.280 E5 23.865	1238 m			
Fr	2x	Vercors (Alpy)	Chamaloc	zatáčky pod západním portálem tunelu, 900 m jjv od vrcholu But de Neve (1656 m)	N44 50.443 E5 24.322	1247 m	16	6	16
Ch	4x	Zadarská županija	NP Paklenica	v pohoří Velebit (RB)	N 44 21.7758 E 15 27.9336	1004 m			
Ma	4x	Aggtelecký kras	Szinpetri	svažitý lem nad silnicí asi 200 m sv. od Szinpetri	N48 29.422 E20 37.891	187 m			
No	2x	Oslo	Hovedoya	skalky a suché trávníky na vápenatých kambrosilurských sedimentech na JZ pobřeží ostrova, FK	N59 53 33.13 E10 43 38.964		11	20	13
No	2x	Oslo	Malmoya	skalky a otevřený borový křivoles na vápenatých kambrosilurských sedimentech na J pobřeží ostrova, FK	N59 51 41.983 E10 45 07.128		11	20	13
No	2x	Oslo	poloostrov Bygdoy	Oslo, vápencové skály na Z pobřeží poloostrova Bygdoy, FK	N59 54 06.124 E10 40 01.337		11	20	13
No	2x	Oslo		malé vápencový výchoz na předměstí Tasenu, FK	N59 56 47.051 E10 45 08.975		11	20	13
No	2x	Oslo	Rikshospitalet	skalky v zářezu potoka na vápenatých kambrosilurských sedimentech u nemocnice, FK	N59 56 56.328 E10 42 42.336				
Po	4x	Ojcowský národní park a okolí	Skała	vápencové skály po obou stranách silnice vedoucí ze Skały do Pieskowy Skały před odbočkou na Ojcow (skalky 300 m J od křižovatky)	N50 13.591 E19 49.840; (N50 13.448 E19 49.777)	344 m	7	6	12
Po	2x	Ojcowský národní park a okolí	Smardzowice	skalka pod jeskyní Ciemna, hned vedle kiosku se vstupenkami a suvenýry	N50 11.864 E19 49.773	309 m	23	21	27

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
Po	2x	Ojcowský národní park a okolí	Kobylany	lesní světlina v Kobylanské dolině na levém břehu potoka	N50 09.492 E19 45.754	314 m	7		
Po	2x	Ojcowský národní park a okolí	Kobylany	úpatí skalek v Kobylanské dolině na levém břehu potoka	N50 09.445 E19 45.549	303 m	23		
Po	2x, 4x	Ojcowský národní park a okolí	Kobylany	úpatí skalek v Kobylanské dolině na levém břehu potoka	N50 09.371 E19 45.411	304 m	12	6	
Po	2x	Ojcowský národní park a okolí	Kobylany	úpatí skalek v Kobylanské dolině na levém břehu potoka	N50 09.407 E19 45.511	303 m			
Po	2x	Ojcowský národní park a okolí	Kobylany	úpatí skalek v Kobylanské dolině na levém břehu potoka	N50 09.478 E19 45.587	300 m			
Po	2x	Pieninský NP	Trzy Korony	na skalách podél cesty i na vrcholové vyhlídce	N49.4138467 E20.4142039		3	3	3
Ra	2x	Waldviertel (Český masív)	Raabs an der Thaya	ruiny hradu Buchenstein	N48 51.330 E15 27.358	464 m	25	25	29
Ra	2x !	Waldviertel (Český masív)	Franzen (u Pölla)	ruiny hradu Dobra	N48 35.523 E15 23.548	460 m	36	37	44
Ra	2x	Kremstal (Český masív)	Hohenstein	ruiny hradu Hohenstein	N48 27.986 E15 26.542	433 m			
Ra	2x	Kremstal (Český masív)	Senftenberg	ruiny hradu Senftenberg	N48 26.867 E15 33.882	336 m	1	9	8
Ra	2x	Kremstal (Český masív)	Imbach	svah podél přístupové cesty k modernímu kostelíku nad zbytky hradu Imbach	N48 26.268 E15 34.508	280 m	1	9	8
Ra	2x	Kremstal (Český masív)	Rehberg	zdivo hradu Rehberg	N48 25.888 E15 35.100	249 m	13	15	15
Ra	2x	Wachau (Český masív)	Dürnstein	staré ruiny hradu Dürnstein	N48 23.877 E15 31.322	358 m			

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
Ra	2x	Bucklige Welt (Alpy)	Klamm-Schottwien	skály okolo hradu Klamm-Schottwien	N47 39.592 E15 52.004	717 m	7	16	26
Ra	2x	Bucklige Welt (Alpy)	Thernberg	skalky kolem hlavní věže zříceniny Thernberg	N47 39.413 E16 11.020	558 m	18	17	17
Ra	2x	Bucklige Welt (Alpy)	Landsee	ruiny hradu Landsee	N47 33.774 E16 20.964	624 m	7	24	38
Ra	4x	Hainburské vrchy (Karpáty)	Bad Deutsch-Altenburg	u železničního přejezdu směrem na Hundsheim	N48 07.834 E16 54.638	164 m	24	33	25
Ra	4x	Hainburské vrchy (Karpáty)	Neue-Siedlung (Hundsheim)	úpatí návrší Hundsheimer Berge, v sadu za vsí u hřiště	N48 07.403 E16 55.761	218 m			
Ra	4x	Hainburské vrchy (Karpáty)	Hundsheim	západní úpatí kopce Hundsheimer Berg, u sportovního areálu, JCH	N48 07 26 E16 55 45		24	33	25
Ra	4x	Hainburské vrchy (Karpáty)	Hainburg an der Donau	louka u kapličky při silnici na vrch Braunsberg	N48 09.548 E16 57.426	221 m	33	33	37
Ra	2x		Rabenstein	u cesty pod hradem Rabenstein (ale kytky byly i nahoře na hradě), JCH	N47 14 49 E15 18 36				
Ru	4x	Bicaz Chei		vápencové skály a holiny v rokli Cheile Sugaului, FK	N46 49 30.601 E25 51 01.8	720 m	2	23	46
Ru	4x	Durau, Ceahlau Mts		otevřená skalní místa a polostinné lesy u vrcholu podél turistické stezky SV od hory Toaca, FK	N46 58 58.087 E25 57 18.734		6	32	6
Ru	2x	Munții Căpățânii (Karpáty)	Polovragi	soutěska Cheile Oltețului, svah nad cestou k jeskyni Peștera Polovragi, LN	N45 11.890 E23 47.099	616 m	24	35	45
Ru	2x	Munții Căpățânii (Karpáty)	Baia de Fier	svah protější stráně jeskyně Peștera Muierii, LN	N45 11.546 E23 45.394	580 m			
Ru	2x	Munții Șureanu (Karpáty)	Bănița	vápencové stěny soutěsky Cheile Băniței, LN	N45 27.059 E23 18.674	575 m			

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
Ru	2x	Munții Șureanu (Karpaty)	Peștera (u Petroșani)	hlavní vchod do jeskyně Peștera Bolii, LN	N45 27.221 E23 19.121	692 m			
Ru	2x	Munții Șureanu (Karpaty)	Crivadia	vápencové stěny soutěsky Cheile Crivadiei, LN	N45 27.732 E23 12.359	594 m			
Ru	2x	Munții Șureanu (Karpaty)	Ohaba-Ponor	údolí mezi obcí Ohaba-Ponor a výtokovou jeskyní Peștera Șura Mare, LN	N45 31.680 E23 08.646	459 m	12	29	34
Ru	4x	Muntele Mare (Karpaty)	Vidolm	nezarostlé místo pod skalkou na tělese bývalé úzkorozchodné tratě Turda – Câmpeni – Abrud	N46 28.563 E23 30.008	409 m	12	28	28
Ru	2x	Muntele Mare (Karpaty)	Poșaga de Sus	hřeben, asi 700 m Z od vrcholu Scărița (1382 m)	N46 29.734 E23 22.028	1350 m			
Ru	2x	Muntele Mare (Karpaty)	Poșaga de Sus	hřeben, asi 400 m Z od vrcholu Scărița (1382 m)	N46 29.740 E23 22.234	1355 m	5	8	5
Ru	2x	Muntele Mare (Karpaty)	Poșaga de Sus	hřeben, asi 280 m V od vrcholu Scărița (1382 m) a okolí	N46 29.859 E23 22.773	1350 m			
Ru	2x	Muntele Mare (Karpaty)	Poșaga de Sus	zářez cesty pod kostelem nad říčkou Poșaga	N46 27.761 E23 22.866	564 m			
Ru	2x	Munții Țarcu (Karpaty)	Poiana Mărului	jižně orientovaná skalka (pravděpodobně minerální bohatší), asi 700 m szz. od jezera Pietrele Albe	N45 18.266 E22 36.087	1850 m			
Ru	2x	Retezat (Karpaty)	Câmpu lui Neag	začátek vápencového kaňonu Cheile Buții	N45 18.138 E22 58.359	960 m			
Ru	2x	Cozia		skály nad hlavní silnicí Sibiu – Râmnicu Vâlcea, naproti Mănăstirea Turnu, FK	N 45 17.3901 E 24 17.79546	315,3 m	24	36	40
Ru	2x	Munții Făgăraș (Karpaty)	Victoria	pata skály hlavního hřebene Făgăraș v jižně orientovaném karu asi 1 km v. od jezera Capra; jediný sterilní trs, LN	N45 36.077 E24 38.655	2100 m			
Ru	2x	Piatra Craiului (Karpaty)	Zărnești	hlavní hřeben Piatry Craiului poblíž vrcholu Țimbalul Mic, LN	N45 32.430 E25 13.344	2200 m			
Ru	2x	Piatra Craiului (Karpaty)	Zărnești	západní svah La Omu při turistické značce, LN	N45 31.576 E25 12.401	2000 m			
Ru	2x	Piatra Craiului (Karpaty)	Zărnești	svahy lomu v Zărnešťské soutěsce při turistické značce, LN	N45 32.504 E25 17.750	850 m			

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
Ru	2x	Piatra Craiului (Karpaty)	Căciulata	skály nad hlavní silnicí Sibiu-Râmnicu Vâlcea, naproti Mănăstirea Turnu	N45 17.390 E24 17.795	315 m			
Ru	4x	Muntii Bistritei	Cheile Zugreni	PM	N 47 24.318 E 25 31.272	760 m	12	34	14
Ru		Piatra Neamt		skalnaté stepi na SZ od Mt Pietricica, FK	N46 55 56.345 E26 22 33.546	373 m			
Ru		Rau de Mori		skalnatý svah nad silnicí do Gura Apelor; erodovaná skalnatý svah, metamorfované, (rula ?), FK et al.	N45 22 40.008 E22 45 29.988				
Sl	2x		mezi Plužna a Žaga	vodopády v Boka, JCH	N46 19 04 E13 29 39				
SR	2x	Velká Fatra	Vyšná Revúca	pěšina traverzující jv svah bezejmené kóty mezi Suchým vrchem (1550 m) a Ostredkem (1550 m); 800 m ssv od Ostredku, 400 m jz od Suchého vrchu	N48 54.499 E19 04.961	1530 m	12	34	14
SR	2x	Velká Fatra	Ľubochňa	úpatí Vysokého vrchu (815 m) na malé svahové lesní světlině při silnici z Ľubochni do Ľubochňanské doliny; 3 km jz od soutoku Ľubochňanky a Váhu	N49 06.119 E19 08.500	500 m			
SR	4x	Pováží / Povážský Inovec	Beckov	skalky při silnici pod kótou 252 (Červená hora); 2,5 km sv. od Beckova	N48 48.744 E17 55.056	395 m	1	3	1
SR	4x	Pováží / Povážský Inovec	Trenčín	bastion hradu Trenčín mezi samotným hradem a lesoparkem	N48 53.574 E18 02.676	315 m	20	19	19
SR	4x	Pováží / Strážovské vrchy	Dubnica nad Váhom	levý břeh vážského kanálu u mostu mezi Dubnicou a Bolešovem	N48 58.217 E18 09.670	234 m			
SR	2x !	Strážovské vrchy	Dolná Poruba	vrcholové, západně orientované skalky pod kótou 842,2 km s. od sedla Homolka; na modré tur. zn.	N48 55.343 E18 19.611	843 m			
SR	2x	Strážovské vrchy	Třstie	lom v údolí Strážovského potoka; 2 km j. od Třstie	N49 01.330 E18 26.295	359 m	12	28	28
SR	2x	Malá Fatra	Terchová	vstupní kaňon Tiesňavy do Vrátné doliny u mostu přes Varínku; asi 0,5 km j. od Terechové	N49 14.713 E19 02.318	557 m			

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
SR	2x	Malá Fatra	Lučivná	lom v údolí Zázrivky, poblíž rekr. střediska Lučivná, při silnici směrem na Párnicu; úpatí kóty 712 (Bralo)	N49 12.554 E19 09.926	491 m			
SR	2x	Orava	Oravský Podzámok	hradní skála Oravského hradu	N49 15.736 E19 21.463	561 m	7	14	24
SR	2x	Chočské vrchy	Prosiek	spodní část Prosiecké doliny (modrá tur. zn.)	N49 09.556 E19 29.858	645 m	10	3	11
SR	2x	Nízké Tatry	Demänovská dolina	skalka nad silnicí v Demänovské dolině	N49 00.141 E19 35.003	582 m	10	3	11
SR	4x	Belanské Tatry	Tatranská Kotlina	skalka nad silnicí u odbočky do Lendaku	N49 13.854 E20 18.981	726 m			
SR	4x	Belanské Tatry	Tatranská Kotlina	most přes Bielu a jeho okolí	N49 13.837 E20 19.090	736 m			
SR	2x	Pieniny	Lesnica	údolí Lesnického potoka, stráň při cestě z Lesnice k Dunajci (modrá tur. zn.)	N49 24.836 E20 27.207	439 m	28	30	31
SR	4x	Slovenský ráj	Vernár	lem nad silnicí mezi Vernárem a Hranovnicí; rez. Vernárská tiesňava	N48 55.865 E20 17.140	742 m	7	6	12
SR	4x	Slovenský ráj	Vernár	lem u lesní cesty, úpatí kóty 1013 (Barbolica), stejnomenná rezervace	N48 55.218 E20 15.742	714 m	20	19	19
SR	4x	Nízké Tatry	Červená Skala	lem silničky asi 100 m s. od mostku přes Hron, naproti ústí Trsteníku	N48 49.141 E20 08.089	800 m	21	12	21
SR	4x	Muránská planina	Červená Skala	skalka na levém břehu Hronu pod ústím Trsteníku	N48 49.120 E20 08.037	795 m			
SR	4x	Slovenský ráj	Stratená	osamělá rostlina v příkopu silnice mezi Stratenou a Telgrátem	N48 53.048 E20 19.053	782 m	33	33	37
SR	4x	Slovenský kras	Krásnohorské Podhradie	okolí vnějšího zdiva hradu Krásna Hôrka	N48 39.515 E20 35.987	488 m	22	10	23
SR	4x	Slovenský kras	Jablonov nad Turňou	okraj státní silnice u železničního mostu	N48 35.907 E20 39.970	324 m			
SR	4x	Slovenský kras	Hačava	stráň nad zástavbou v Hačavě	N48 39.874 E20 50.588	604 m			

země	ploidie	územní jednotka	obec	popis lokality	souřadnice lokality	nadm. výška	cp 1	cp 2	cp 1+2
SR	4x	Cerovská vrchovina	Fiľakovo	sz.stráň pod hradem Filakovo	N48 16.325 E19 49.512	214 m			
SR	2x	Štiavnické vrchy	Sklené Teplice	údolí Teplé, úpatí kopce Bukovec (707 m), skalky při silnici ze Skelných Teplic směrem do Podhorie, asi 1 km j. od Skelných Teplic	N48 30.997 E18 51.583	200 m	17		
SR	4x	Horehroní	Zlatno	mezi silnicí a tratí 1,5 km V od obce, JCH	N 48.8291667 E 20.1052778	750 m	30		
SR	4x	Horehroní	Šumiac	lem silnice do Červené Skaly, 100 m od křižovatky se silnicí 66, 1,4 km JJZ od kostela v obci, JCH	N 48.8277778 E 20.1241667	780 m	31	7	33
SR	2x	Belianské Tatry	Tatranská Kotlina	malá skále směrem k úpatí vstupu do Belianská jaskyňa, FK	N49 13 46.412 E20 18 50.425	873,2 m			
SR	2x	Pieniny	Pieniny, Lesnický potok	říční údolí, 1 km SZ od Lesnice, FK	N49 24 51.059 E20 27 10.08	444,4 m			
SR	2x	Čergov	Kamenica	Predné, vápencové skály, FK	N49 12 38.689 E20 55 41.462	632,6 m			
SRB		Železná vrata	Golubac	6 km V od obce Golubac, svahy nad silnicí a zastíněné vápencové skály, FK	N2 44 39.6 E32 48 21.1				
Uk	2x	Ivano-Frankivska oblast	Fraha	suchý trávník na vrcholu kopečku nad polní cestou odbočující ze silnice H09 na východ, asi 200 m V od obce. FKr	N 49.4683333 E 24.4483333	255 m	7	5	7
Uk		Volovecký rajon	Pikuy	skály na vrcholu, PM		1407 m			

3.2.3. Analýza cpDNA

U fylogeografických studiích zaměřených na migraci rostlin se často používá plastidová DNA, protože 1) u většiny krytosemenných rostlin je děděna pouze po mateřské linii (semeny) a nedochází k rekombinacím při meioze, a lze tak sledovat migrační linie, 2) je relativně konzervativní, i když často vykazuje variabilitu i na vnitrodruhové úrovni (což je i případ druhu *Libanotis pyrenaica*). Zdrojem variability v plastomu jsou většinou bodové mutace.

Pro analýzy jsem brala pouze jednu rostlinu za populaci, s výjimkou cp1 (viz dále), kde jsem v případě jedné populace (tetraploidní populace z Řečan v Polabí) analyzovala pět rostlin – čtyři byly zcela totožné. Také jsem brala po dvou rostlinách z dalších dvou lokalit, ty už ale byly zcela totožné. Pro výslednou analýzu jsem použila 82 vzorků *Libanotis*, jeden *Seseli osseum* (z Prokopského údolí v Praze, původně zamýšlený jako outroup, jak se ale ukázalo tak má haplotyp identický s jedním z haplotypů *Libanotis pyrenaica*) a jednu rostlinu *Pimpinella saxifraga* (outgroup). Do sítě TCS byly zahrnuty všechny vzorky, další analýzy již probíhaly jen na jednotlivých haplotypech získaných z TCS.

Pro cp2 (viz dále) jsem použila již jen 74 vzorků *Libanotis pyrenaica* (z toho byly odstraněny některé vzorky a nahrazeny jinými – viz tab. 2, protože na ně špatně nasedaly primery atp.)

Pro následné spojení obou chloroplastových úseků tedy bylo použito jen 70 vzorků *L. pyrenaica* plus outgroup.

3.2.3.1. Izolace DNA, gelová elektroforéza a vizualizace DNA, PCR, purifikace

Pro izolaci DNA jsem používala sorbitolovou extrakci (jedná se sice o zdlouhavější metodu, ale levnější). Po vysušení pletiv byla část dána spolu se dvěma wolframokarbidovými kuličkami do popsané 2 ml eppendorfký, rozdrčena (stačila 1,5 min na rychlost 27 rpm v drtičce), načež se přidala špetka polyvinylpyrrolidinu (PVP) na likvidaci sekundárních metabolitů. Do eppendorfký se přidalo 1 300 μ l extrakčního pufru EP (směs TRIS-HCl pH 7,5, EDTA pH 8, sorbitolu a merkaptioethanolu) smíchaného s merkaptioethanolem (1 μ l ME na 1 ml EP) a přidaly se 4 μ l RNAsy, eppendorfka se promíchala v ruce. Centrifugovala se 5 min na 7 000 rpm, pak se odstranil supernatant. K peletu se přidalo dalších 300 μ l EP (opět s ME), resuspendovala se a přidalo se 300 μ l lysis pufru (směs TRIS-HCl pH 7,5, EDTA pH 8, NaCl, CTAB). Inkubovalo se 15 min v 65°C v thermobloku, - za třesení na 900 rpm. Poté se přidalo 600 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol (24:1), 1 min se rychle promíchávalo a dalo se centrifugovat na 10 min

o 9 000 rpm. Horní vodní fáze, cca 600 µl, se následně přepipetovala do nové popsané eppendorfky (předchozí krok – přidání stejného množství chloroform:isoamylalkoholu, 1 min se promíchávání a opět centrifugování - lze zopakovat pro lepší čistotu výsledné DNA). Odebrala se horní vodní fáze – 600 µl a přidalo se 400 µl vymraženého isopropanolu. Jemně se promíchalo rukou a na půl hodiny se vzorky uložily do mrazáku. Potom se vzorky centrifugovaly ve vychlazené centrifuze (4°C) 15 min na 13 000 rpm. Pomalu se odlil supernatant, k peletu se přidalo 700 µl 80% ethanolu, 2 min se promíchávalo, pak centrifugovalo 1 min na 13 000 rpm, slil se supernatant, eppendorfka se postavila dnem vzhůru na ubrousek a nechala se okapat. Když už v eppendorfkách nebyly příliš velké kapky ethanolu, dosušily se v thermobloku na 60°C 10 min (nemělo by se déle, aby se nedegradovala DNA). Nakonec se k peletu se přidalo 70 µl Te pufru (v závislosti na velikosti peletky) a nechal se rozpouštět v thermobloku 10 min při 60°C – případně v lednici přes noc. DNA v eppendorfce se již jen zvortexovala, krátce stočila a změřila se koncentrace na Nanodropu. DNA se uchovávala v lednici. Najednou se izolovalo obvykle 24 vzorků.

PCR:

PCR mix: (cp1)

13,2 µl rrH₂O
pufr Gold (10x koncentrovaný) 2 µl
MgCl₂ (25mM) 2 µl
dNTP (100m M) 0,8 µl
primer 0,4 forward – trnL
0,4 revers – trnF
polymeráza Gold 0,2 µl

19 µl PCR mixu se napipetovalo do stripů a přidala se DNA (1 µl) o koncentraci 10 ng/µl.

Stripy se vložily do cykleru s programem:

95°C 10 min
35 x (95°C 30s
55°C 30s
72°C 1 min)
72°C 7 min
10°C libovolně dlouho před vyndáním.

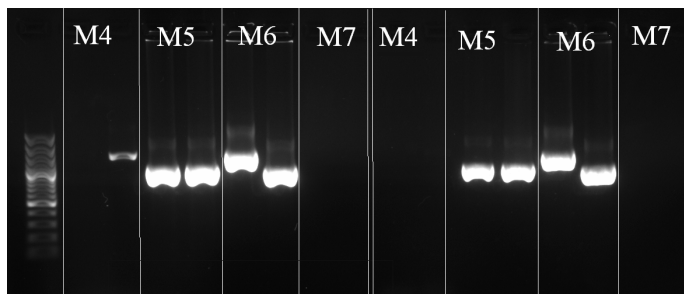
Jako druhou dvojici primerů jsem používala cpo18L-cpo20R (Ebert & Peakall 2009) s polymerázou My Tag.

PCR mix pro primery cp018L-cp020R:

rrH₂O 14 µl
pufr 4 µl
primer forward 0,4 µl
 revers 0,4 µl
polymeráza My Tag 0,2 µl

Cyklus PCR v cykleru:

95°C 1 min
35x (95°C 30s,
 55°C 1min,
 72°C 1min),
72°C 15min,
10°C do vyjmutí



Obr. 8: Optimalizace PCR. Na obrázku je vyfotografovaný gel po elektroforéze, žebřík 100bp a čtyři různé mixy (M4 rpoB-trnC, M5 – trnF-trnL, M6 – trnQ-rps16, M7 – rpl 32-ndhF) po dvou vzorcích a dvou teplotách (první čtyři t=55°C, zbylé t=60°C). Polymeráza MyTag. Je vidět výrazná variabilita mezi délkou produktu obou vzorků v M6. Pro M4 je teplota zřejmě moc nízká, u M7 nevyšlo nic. (Kodak Gel Logic 100, upraveno).

Elektroforéza:

Nejprve se uvařil 1% gel TAE (pufr TAE, agaróza,- dle velikosti elektroforetické vany. Po zatuhnutí se z něj vyndaly hřebeny, čímž vznikly dírký pro nanesení vzorků. Gel se přesunul do vany a zalil pufrem TAE. Následně se na něj nanesly vzorky – 1 µl barvičky, 2 µl vzorku a 1,5 µl žebříku (100 bp), udělala se elektroforéza. Po vyjmutí z elektroforetického roztoku se přesunul gel pod UV transluminátor. Gel byl vyfotografován a prohlédnut pomocí programu Kodak Gel Logic 100.

Purifikace DNA

DNA jsem přečišťovala podle komerčního kitu Genaid, dle protokolu.

Nakonec se již jen změřila koncentrace a čistota vzorku (Nanodrop) a namíchala sekvenační reakce.

Sekvenační reakce: 1 µl primeru o 3,2 konc. dle použitých primerů, množství DNA se vypočítalo na základě délky z gelu a koncentrace, doplnilo se rrH₂O na 8 µl a odneslo na sekvenátor ABI 3100 Avant v Sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK ve Viničné ulici.

Vzhledem k délce výsledného produktu (cca 602–1076 bp u cp1, v mém případě dle gelu cca 1 100 bp) bylo nutné posílat na sekvenátor každý vzorek dvakrát, jednou s forward- a podruhé s revers primerem. Výsledné sekvence se dále ručně editovaly a spojovaly, viz dále.

K cp2 byla použita jiná polymeráza, takže se míchal odlišný PCR mix a cyklus v cyklu byl také odlišný. Jinak bylo vše shodné s předchozím, akorát na sekvenátor bylo možné posílat vzorek pouze s jedním primerem, neboť výsledná sekvence je dlouhá do 500 bp a sekvenátor ji přečte celou a není tudíž nutné následné spojování dvou sekvencí v jednu.

Při optimalizaci jsem vyzkoušela primery: trnS-trnG2S, psbJ-petA, trnH-psbA, rpoB-trnC, trnFb-trnLc, trnQ_{uu}G-rps 16x1, rpl32-R-ndhF, cp001-cp002, cp018L-cp020R, cp034R-cp033L, cp051L-cp052R, trn S-trnG s polymerázou My Tag s různými teplotami, pak jsem změnila polymerázu na GOLD – primery trnS-trnG2S, psbJ-petA, trnH-psbA, rpoB-trnC, trnFf-trnLc, trnQ uvG-rps 16x1, rpl 32R- ndhF, rpl 32-trnL, 3´trnV-ndhC.

Jako nejlepší se ukázal pár primerů trnF-trnL (dále cp1; Taberlet et al. 1991) a cp018L-cp020R (dále cp2; Ebert & Peakall 2009).

Většina ostatních se špatně vázala, anebo výsledná sekvence ze sekvenátoru byla špatně čitelná, někdy dokonce přerušovaná, u dvojice trn Q-rps16 byly již na gelu vidět velké rozdíly ve velikosti PCR produktu (obr. 8) a následně byly nalezeny i v sekvenci obrovské indely, o nichž jsme nevymysleli, jak je vyhodnotit.

3.2.3.2. Analýza dat

Sekvence byly nejdříve prohlédnuty, odstraněny chyby při čtení v programu Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd 2012). Zároveň byly oříznuty nečitelné počáteční a koncové části. V případě použití primerů trnL-trnF byla navíc spojena počáteční a koncová část (sekvenátor není schopen číst víc než cca 800 bází, trnL-trnF se pohybuje i nad 940 bp, viz Taberlet et al. 1991). Pro každý úsek a pro spojený marker byl vytvořen a ručně upraven alignement v programu Bioedit (Hall 1999), takže vznikly 3 alignmenty. Všechny tři datasety byly dále analyzovány programy TCS, PAUP a MrBayes. Počet haplotypů byl zjištěn pomocí aplikace Fabox (www 15).

Nejprve byla provedena analýza haplotypů pomocí parsimonických haplotypových sítí v programu TCS 1.21 (Clement et al. 2000). Alignmenty byly v aplikaci Fabox převedeny do formátu pro program TCS. Indely byly ručně kódovány, limit pro spojování byl u jednotlivých datasetů 95 %, 93 % a 93 %, parametr gaps=missing. Grafická úprava výstupu byla provedena v programu TCS 1.21 a Adobe Photoshop CS2 (Shelly 2006).

Fylogenetické analýzy byly provedeny metodou Maximum Parsimony (MP) v programu PAUP4 (Swofford 2002) a Bayesovská anýza v programu MrBayes 3.1 (Ronquist

& Huelsenbeck 2003). Gapy byly kódovány jednoduchým kódováním (simple coding, Simmons & Ochoterena 2002) v programu SeqState (Müller 2005).

Metoda maximální parsimonie hledá fylogramy s co nejmenším počtem kroků (mutací). Výpočetní algoritmus nakonec složí jeden či více výsledných stromů jako konsenzus stromů nejlepších pro jednotlivé pozice. Metoda maximální parsimonie byla provedena pomocí heuristického vyhledávání branch-swapping algoritmem tree-bisection-reconnection (TBR), s přidáváním sekvencí v náhodném pořadí a počtem replikací 100. Statistická podpora jednotlivých větví stromu byla vyjádřena hodnotami bootstrapu, které byly spočteny pro 1 000 opakování. Pro každou analýzu byly zaznamenány počty maximálně parsimonních stromů, jejich celková délka, celkový index konzistence (CI) a retence (RI). Stromy byly vizualizovány v programu TreeView (Page 2001) a graficky upraveny v programu Adobe Photoshop CS2 (Shelly 2006).

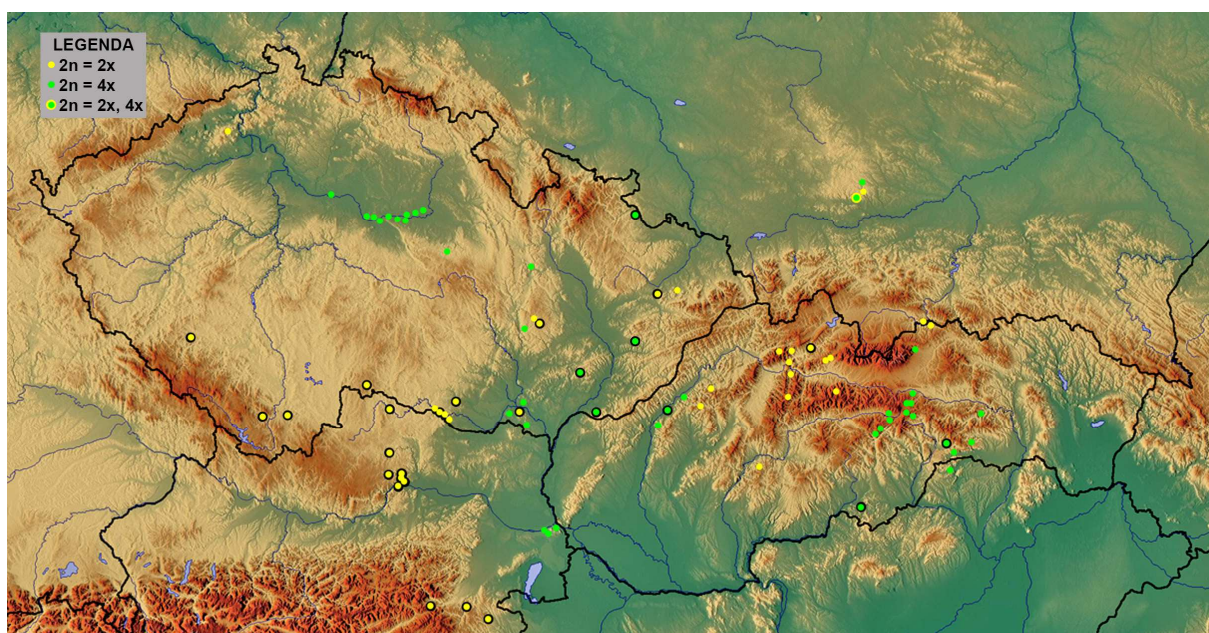
Substituční modely pro jednotlivé datasety pro Bayesovskou analýzu byly vybrány pomocí programu MrModelTest.2 (Nylander 2004) a vloženy do vstupního souboru. Analýza běžela po 1 000 000 generací, stromy byly zaznamenávány každou 100. generaci, burn-in byl nastaven na 300.

3.3. Výsledky

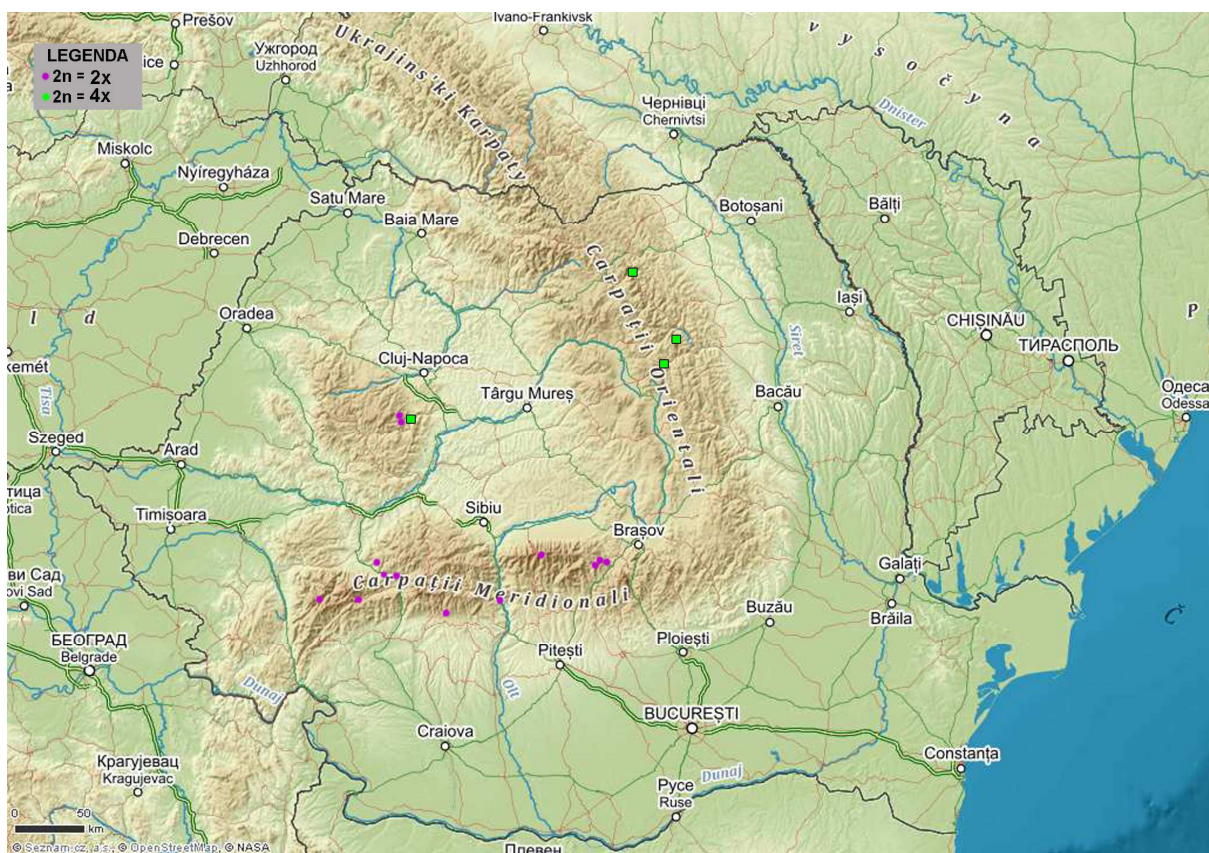
3.3.1. Cytogeografie

Celkem jsem analyzovala 1637 rostlin ze 148 populací; u 92 populací jsem naměřila velikost jaderného genomu odpovídající diploidům, u 56 odpovídající tetraploidům. Výsledky jsou zaneseny do map (Česká republika, Slovensko a okolí obr. 9, Francie a Německo obr. 7, Rumunsko obr. 10). V polských Kobylanech jsem zjistila smíšenou populaci diploidních a tetraploidních rostlin.

Diploidní populace byly zjištěny v celém studovaném území, v nadmořských výškách 200–2 200 m n. m., zejména na skalách, často vápencových, hradních zříceninách a sušších loukách. Tetraploidní populace byly naopak nalezeny v nadmořské výšce 164–1 004 m n. m. (v České republice jsem je našla v max. výšce 517 m n. m., další údaje pocházejí ze Slovenska, Rumunska a nejvyšší poloha nalezená pro tetraploida 1004 m pochází z Velebitu v Chorvatsku).

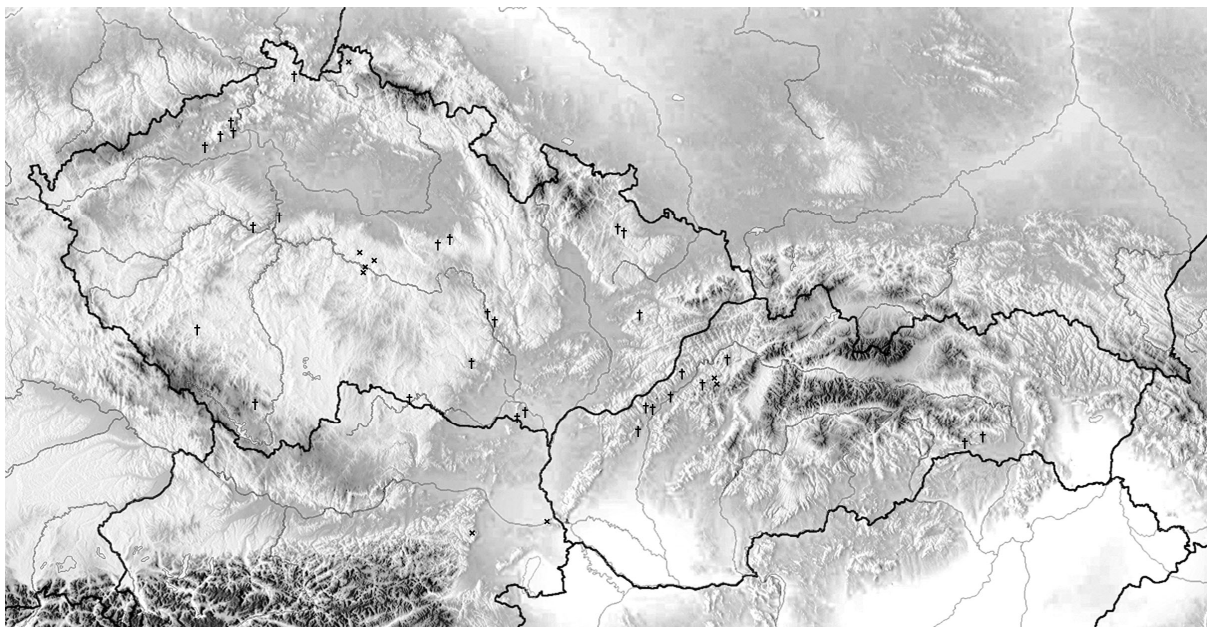


Obr 9: Rozšíření diploidního (žlutá barva) a tetraploidního (zelená barva) cytotypu v ČR, na Slovensku a v sousedních územích. Jediná smíšená populace (v Polsku) je vyznačena soustřednými kruhy žluto-zelenými. Sběry z hradů a hradních zřícenin jsou ohraničeny černě.



Obr 10: Rozšíření diploidního (fialově) a tetraploidního cytotypu (zeleně) v Rumunsku u. Diploidní populace se nacházejí spíše ve střední části a na jižní části Karpat, tetraploidní spíše na východ.

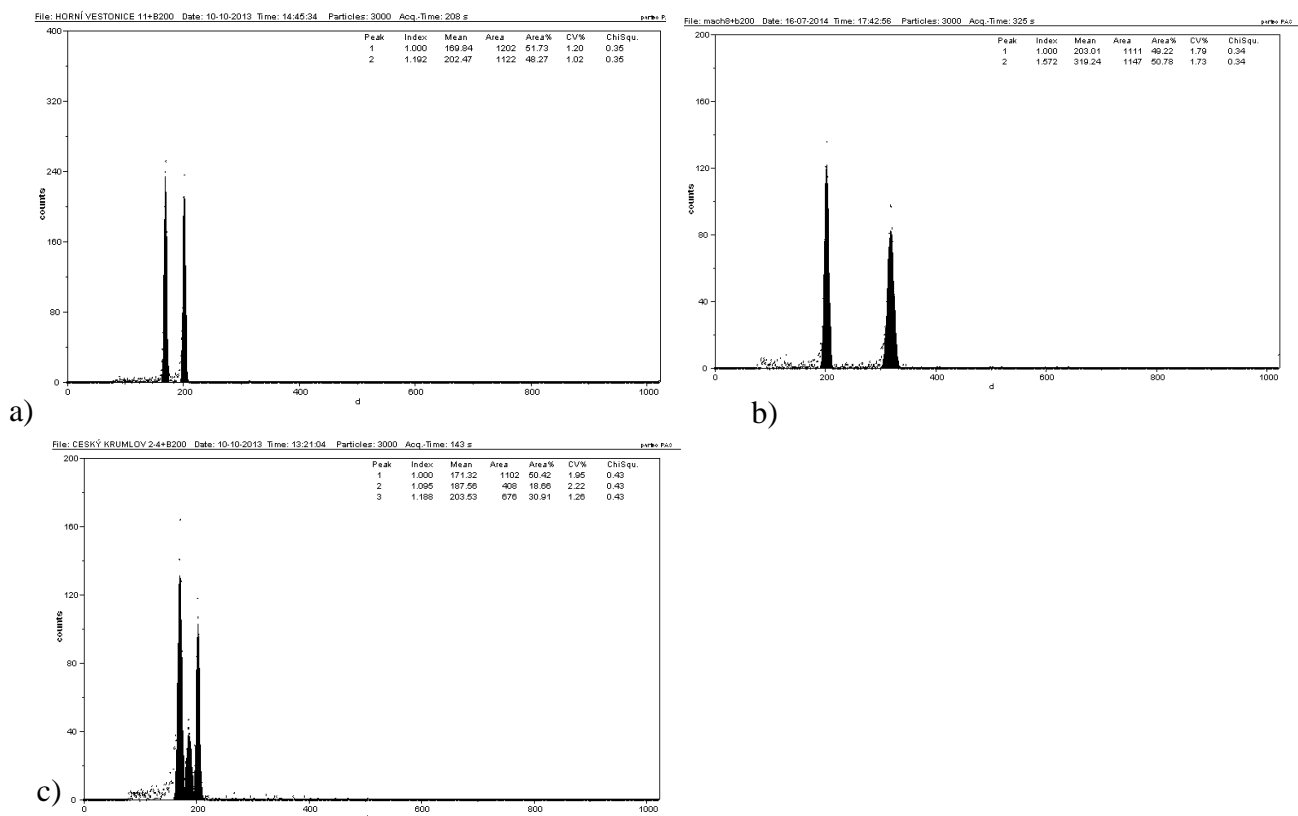
Absolutní velikost jaderného genomu u diploidních rostlin se pohybuje v rozmezí 2,59–3,14 pg, u tetraploidních 4,89–5,87 pg. Relativní velikost genomu se pohybuje u diploidních rostlin v rozmezí 2,26–3,37 a u tetraploidních v rozmezí 4,98–5,89 pg (Tab. 3).



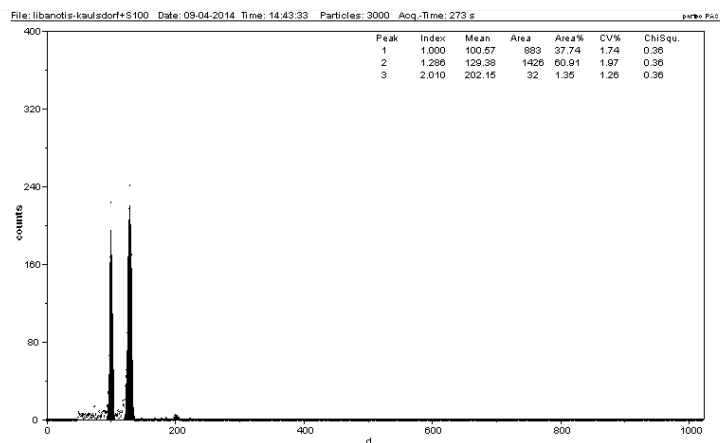
Obr. 11: Mapa s vyznačenými lokalitami, odkud byla *L. pyrenaica* literárně udáváná, ale nám se výskyt nepodařil ověřit (křížek) a místa, která by biotopem připomínala lokality jejího výskytu, ale nejsou udáváná literaturou a rostlinu se nám tam také nepodařilo zaznamenat (x). Jednotlivé lokality viz příloha tab. 1 a 2.

Tabulka 3: Velikost jaderného genomu na základě měření v případě absolutní velikosti genomu 138 analýz (z některých populací je zastoupeno více rostlin) a 417 analýz (obvykle směsných vzorků) v případě relativní velikosti genomu, analýzy s CV nad 4 nebyly zahrnuty.

ploidie	relativní velikost genomu (v pg)		absolutní velikost genomu (v pg)
diploid	min	2,263	2,592
	max	3,378	3,139
	průměr	2,912	2,772
	směrodatná odchylka	0,117	0,111
	CV standart	1,92	2,86
	CV standart směrodatná odchylka	0,544	0,539
	CV vzorku	2,49	2,709
	CV vzorek směrodat odch	0,67	0,57
tetraploid	min	4,983	4,894
	max	5,89	5,879
	průměr	5,36	5,236
	směrodatná odchylka	0,6	0,229
	CV standart	2,11	2,763
	CV standart směrodatná odchylka	0,606	0,589
	CV vzorku - průměr	2,381	2,66
	CV vzorku směrodatná odchylka	0,683	0,496



Obr. 12: Ukázka výstupu z cytometru. Osa x vyjadřuje počet měřených jader, osa y relativní fluorescenci. Za interní standard byla použita *Bellis perennis*, pík na 200. a) diploidní populace z Horních Věstonic (pík vlevo) b) tetraploidní populace z Machové (pík vpravo) c) diploidní populace v Českém Krumlově, kde jsou zachyceny dvě rostliny *L. pyrenaica* s normální relativní velikostí diploidního genomu a jednou rostlinou s trochu větším genomem. Může se jednat např. o aneuploidii. Za standard použita *Bellis perennis*, na 200 – pík nejvíc vpravo.



Obr. 13: Rostlina z německého Kaulsdorfu změřená se standardem *Solanum* (100), protože se překrývala s *Bellis perennis*. Rostlina byla jen jedna, ve vegetativním stavu a nejspíš se jednalo o záměnu za jiný druh. Relativní velikost genomu byla 3,36 pg. Osa x vyjadřuje počet měřených jader, osa y relativní fluorescenci.

Z tabulky 3 vyplývá, že diploidní jedinec má velikost cca 2,91 pg, dalo by se tedy předpokládat, že triploidní jedinec by se mohl pohybovat kolem 4,3 pg. Žádnou takovou rostlinu jsem ale během svých analýz nezaznamenala.

Během měření byly zaznamenány i odlišné velikosti genomu u některých rostlin v rámci

populace (v tabulce 2 značeno vykřičníkem). Týkalo se to primárně diploidních populací (např. obr. 12c histogram různě velké relativní velikosti genomu u rostlin z Českého Krumlova).

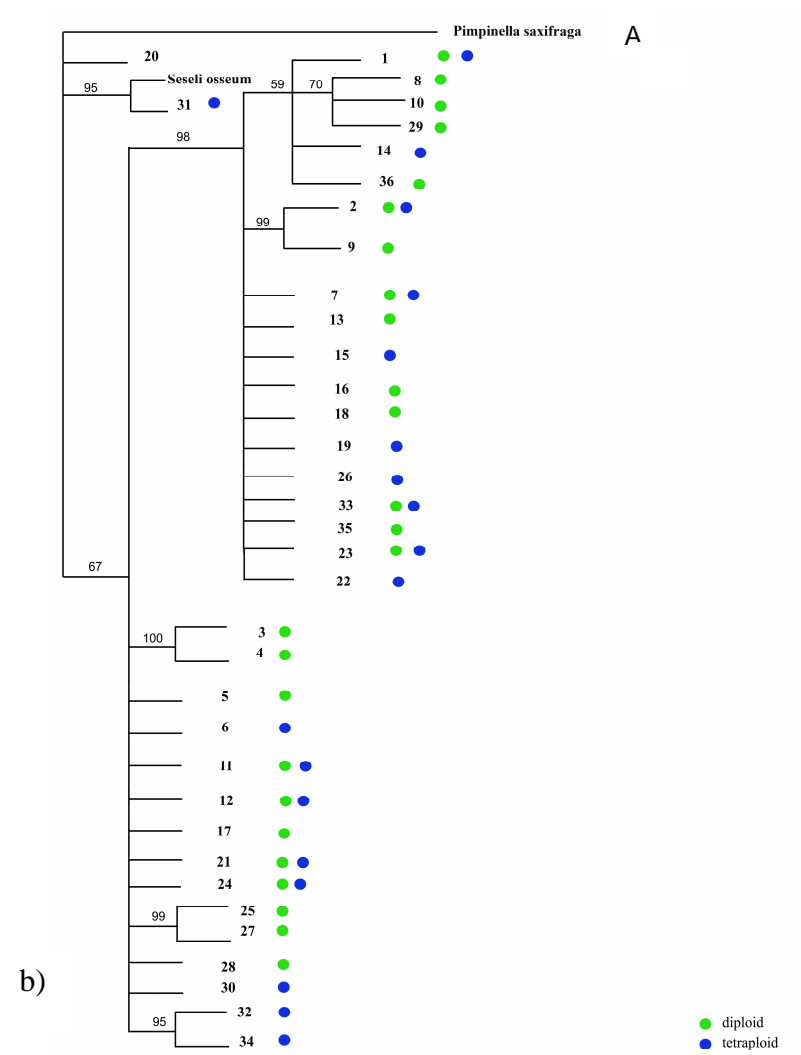
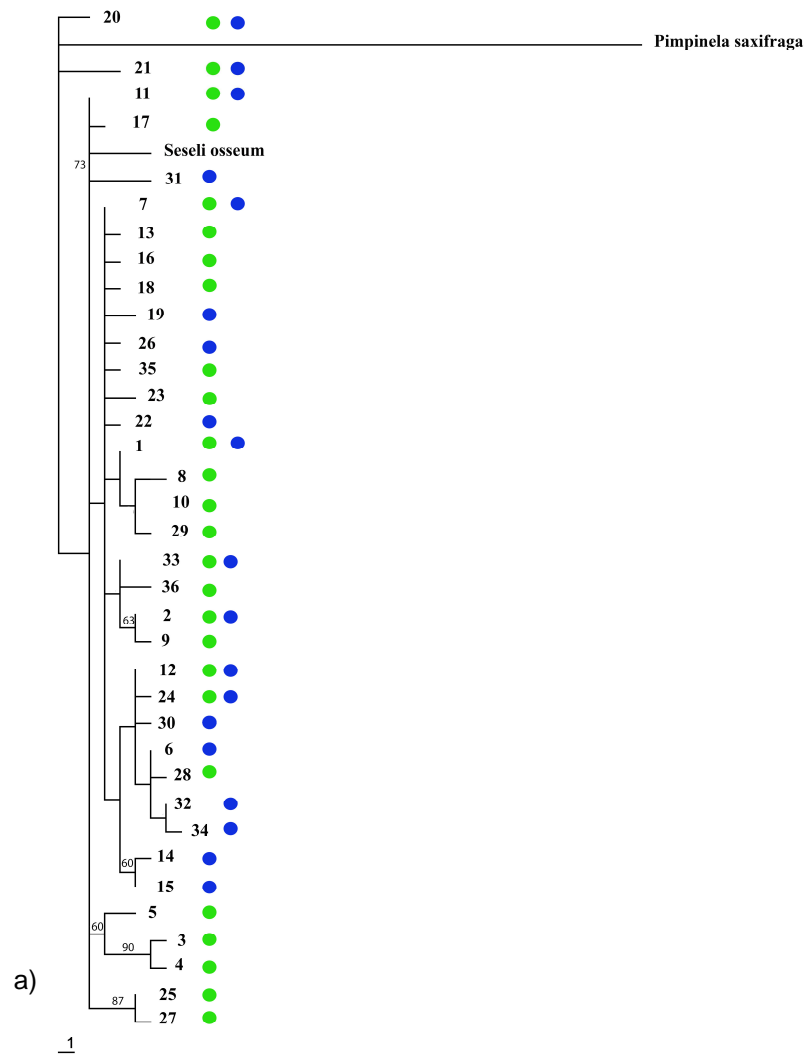
3.3.2. Analýza cpDNA

Cp1 (trnF-trnL)

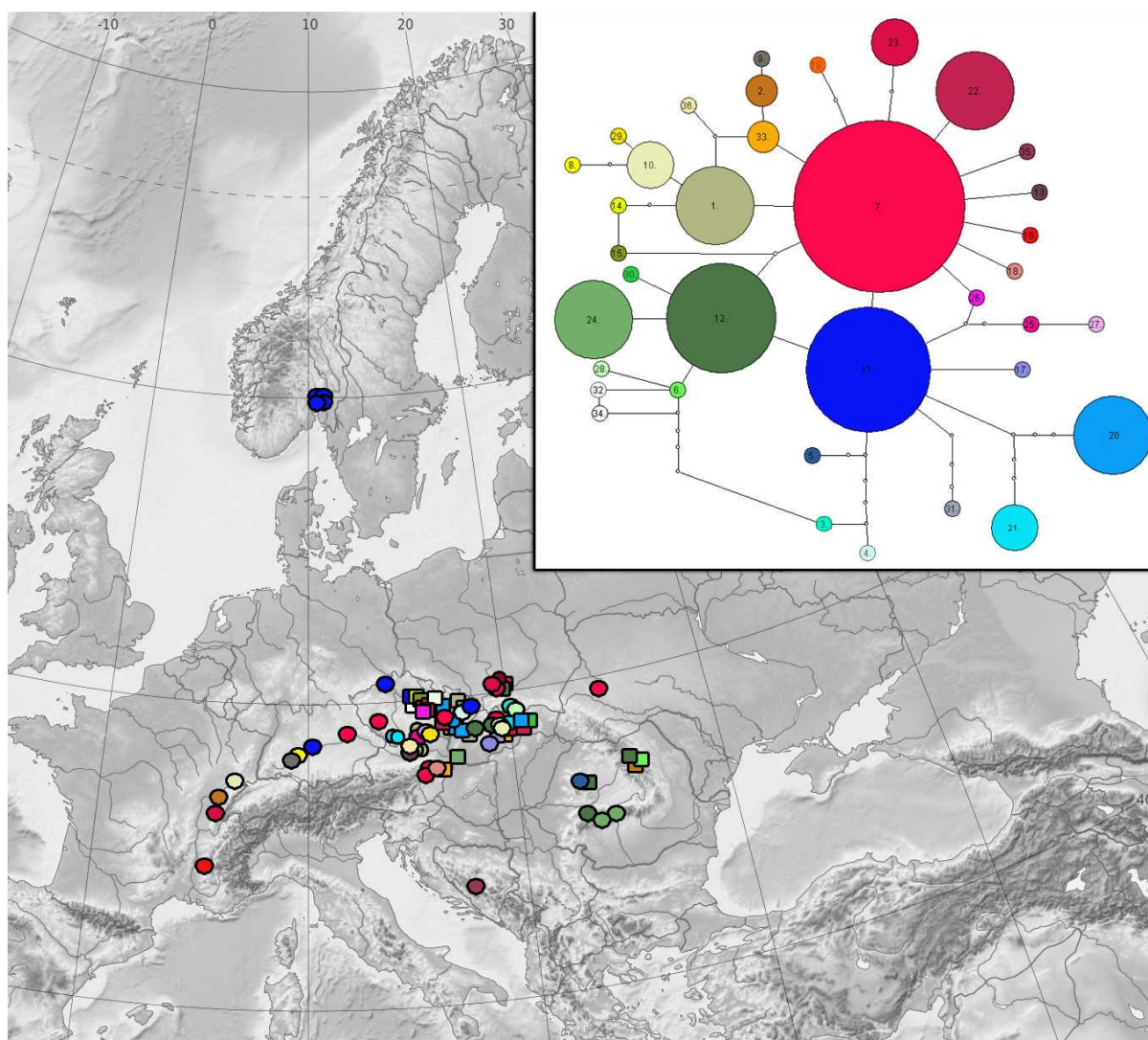
Matice [trnF-trnL] zahrnuje 996 znaků v alignmentu a 16 insercí v délce 1-21 bp, tj. celkem 1012 znaků pro 37 ingroup haplotypů a jeden outgroup taxon. Počet variabilních znaků je 82, z toho 16 insercí a 66 substitucí. Parsimonní analýzou bylo získáno 3115 optimálních (most parsimony) stromů s délkou 95 kroků s indexem konzistence (CI) 0,863 a indexem retence (RI) 0,794 (obr.14a).

Pro Bayesovskou analýzu byl zvolen substituční model HKY+G, nst=2 a evoluční model rates=gamma, navržený jak při použití Hierarchicallikelihood ratio test, tak i Akaikeinformationcriterion. Strom je na obr. 14b.

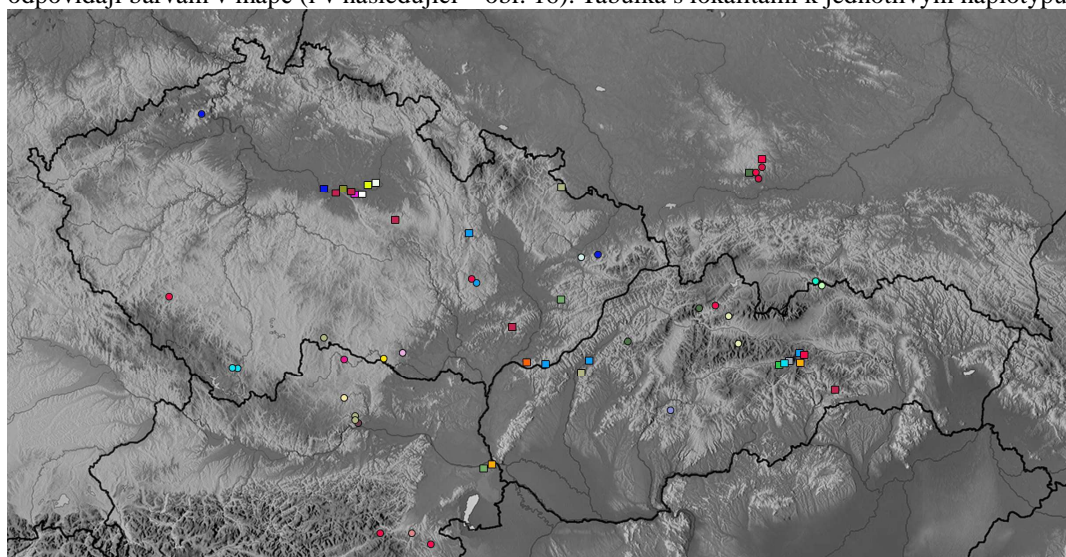
Celkem bylo rozlišeno 36 haplotypů, zahrnujících 1–11 (z celkových 82) vzorků.



Obr. 14: Fylogenetická analýza *Libanotis pyrenaica* založená na chloroplastovém úseku trnF-trnL (cp1). Kolečka ukazují zastoupení ploidii v jednotlivých haplotypech. Čísla haplotypů viz tabulka 2, odpovídají číslům v tcs síti na obr. 15 (a v přílohách) a mapám (obr. 15, 16). a) Fylogenetická analýza vypočtená metodou MP; v uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu >50 %, b) vypočtená Bayesovskou analýzou; v uzlech jsou uvedeny posteriorní pravděpodobnosti.



Obr. 15: Rozšíření haplotypů chloroplastového úseku *trnF-trnL* (cp1) v Evropě s haplotypovou sítí TCS v pravém horním rohu. Kolečka znázorňují diploidní rostliny, čtverečky tetraploidní rostliny. Barvy v síti odpovídají barvám v mapě (i v následující – obr. 16). Tabulka s lokalitami k jednotlivým haplotypům viz tab. 2.



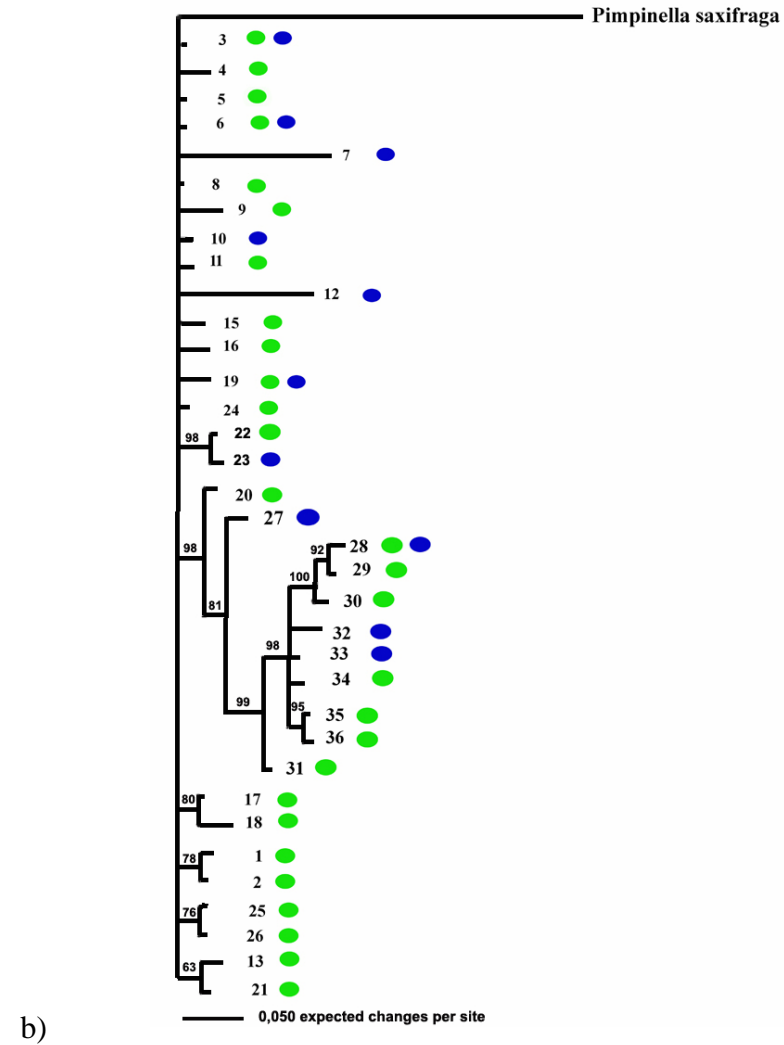
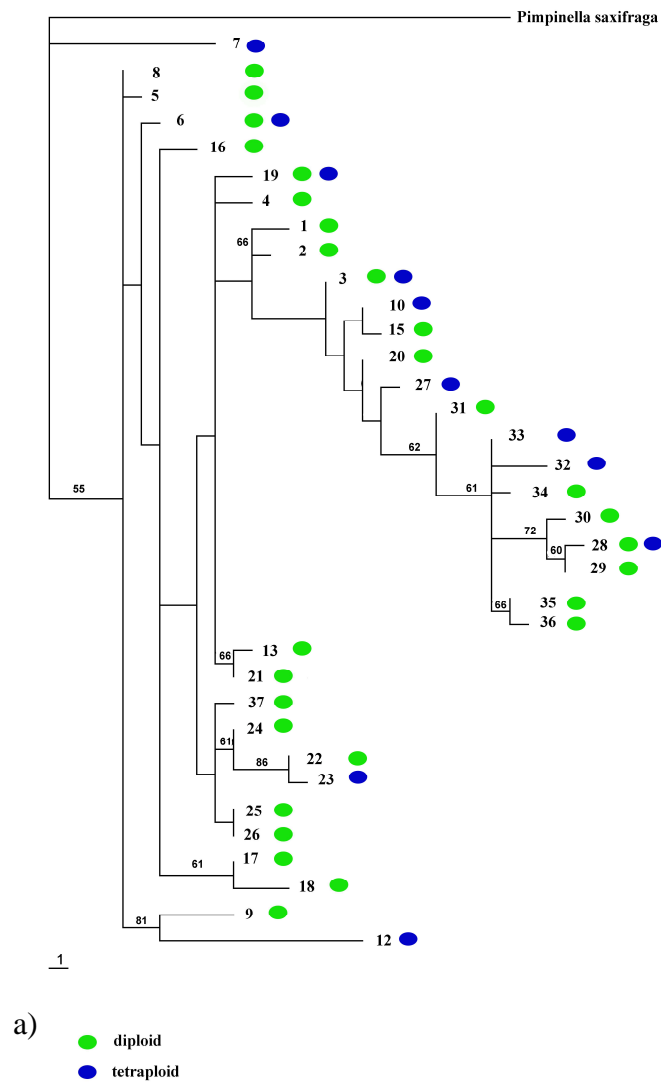
Obr. 16: Rozšíření haplotypů chloroplastového úseku *trnF-trnL* (cp1) v ČR, na Slovensku a v sousedních územích. Kolečka znázorňují diploidní rostliny, čtverečky tetraploidní rostliny. Barvy odpovídají těm v haplotypové síti na předchozím obr. 15 a v TCS síti v přílohách.

Cp2 (cp018L-cp020R)

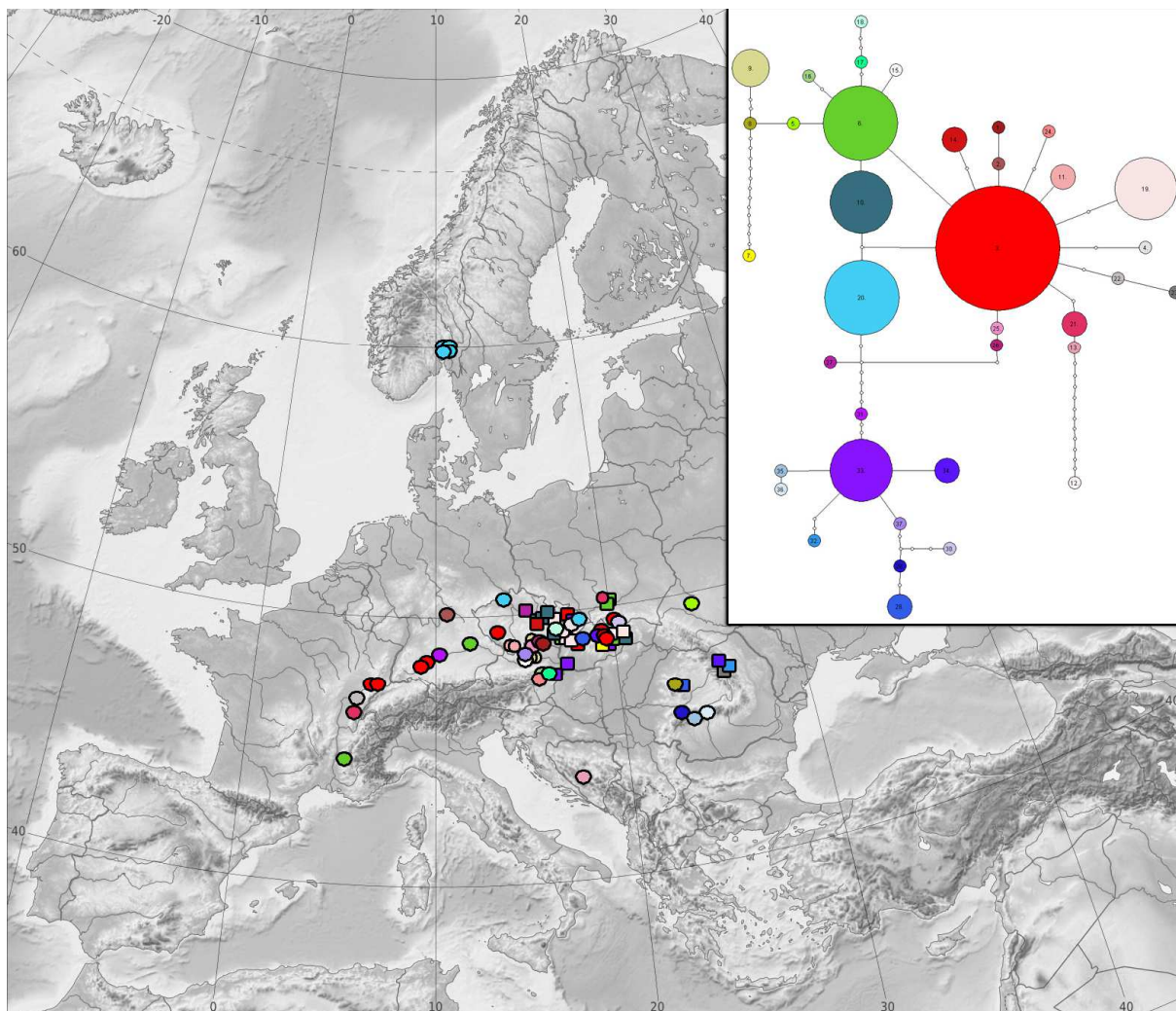
Matice cp018L-cp020R zahrnuje 504 znaků v alignmentu a 26 insercí v délce 1-30 bp, tj. celkem 530 znaků pro 35 ingrouphaplotypů a jeden outgroup taxon. Počet variabilních znaků je 81, z toho 26 insercí a 55 substitucí. Parsimonní analýzou bylo získáno 9700 optimálních (most parsimony) stromů s délkou 110 kroků s indexem konzistence (CI) 0,818 a indexem retence (RI) 0,835 (obr. 17a).

Pro Bayesovskou analýzu byl zvolen substituční model F81+G, nst=1 a evoluční model rates=gamma navržený Hierarchical likelihood ratio testem; parametry best fit modelu na základě Akaike information criterion jsou model HKY+I, nst=2, rates=propinv. Strom je na obr. 17b.

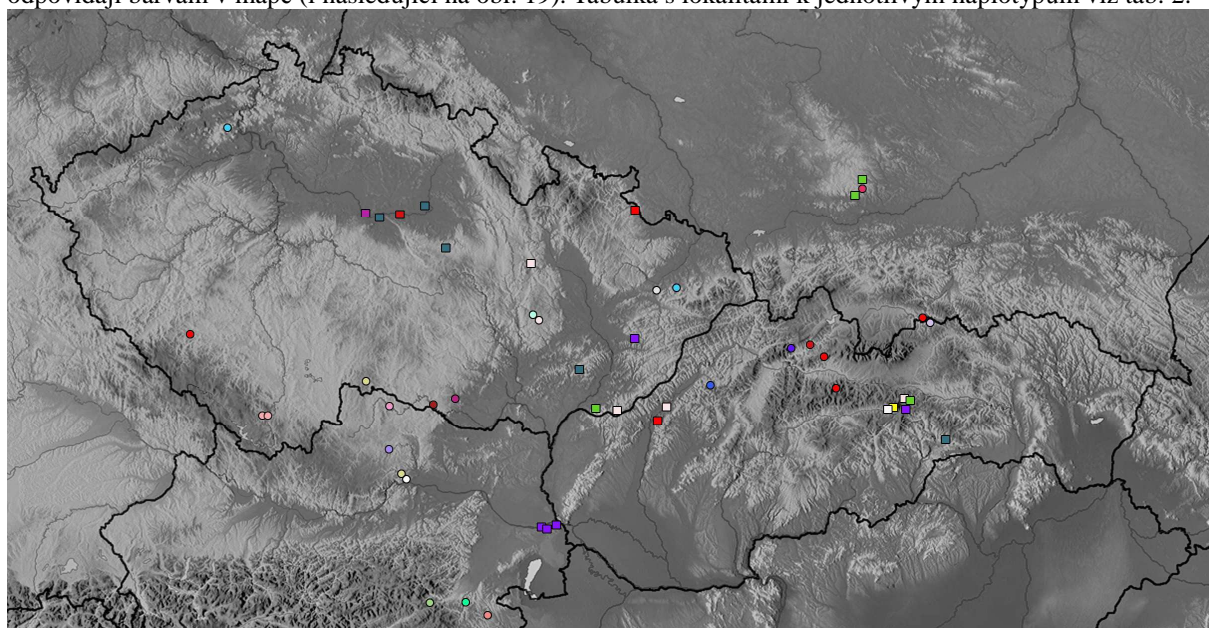
Celkem bylo rozlišeno 37 haplotypů, zahrnujících 1–10 (z celkových 74) vzorků.



Obr 17: Fylogenetická analýza *Libanotis pyrenaica* založená na chloroplastovém úseku cp018-cp020 (cp2). Kolečka ukazují zastoupení ploidii v jednotlivých haplotypech. Čísla haplotypů viz tabulka 2, odpovídají číslům v tcs síti na obr. 18 (a v přílohách) a mapám (obr. 18, 19). a) Fylogenetická analýza vypočtená metodou MP; v uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu >50 %, b) vypočtená Bayesovskou analýzou; v uzlech jsou uvedeny posteriorní pravděpodobnosti.



Obr. 18: Rozšíření haplotypů chloroplastového úseku cp018-cp020 (cp2) v Evropě s haplotypovou sítí TCS v pravém horním rohu. Kolečka znázorňují diploidní rostliny, čtverečky tetraploidní rostliny. Barvy v síti odpovídají barvám v mapě (i následující na obr. 19). Tabulka s lokalitami k jednotlivým haplotypům viz tab. 2.



Obr. 19: Rozšíření haplotypů chloroplastového úseku cp018-cp020 (cp2) v ČR, na Slovensku a v sousedních územích. Kolečka znázorňují diploidní rostliny, čtverečky tetraploidní rostliny. Barvy odpovídají těm v haplotypové síti na předchozím obr. (18) a v přílohách. Tabulka s lokalitami viz tab. 2.

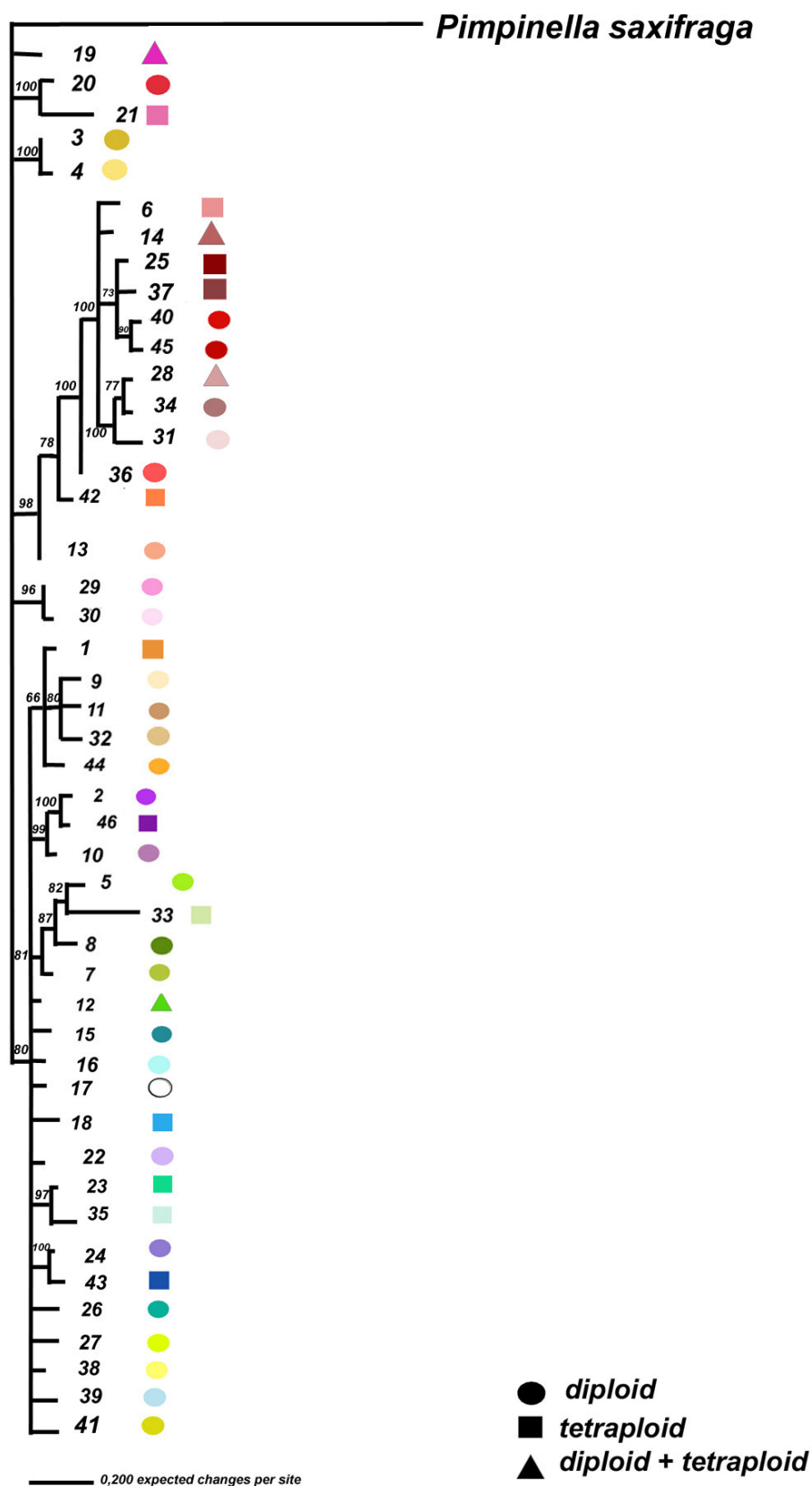
Cp2 + cp2 (spojené úseky trnL-trnF a cp018-cp020R)

Matice zahrnuje 1499 znaků v alignmentu a 42 insercí v délce 1–30 bp, tj. celkem 1541 znaků pro 47 ingrouphaplotypů a jeden outgroup taxon. Počet variabilních znaků je 160, z toho 42 insercí a 118 substitucí, parsimonně informativních znaků je 52. Parsimonní analýzou bylo získáno 8500 optimálních (most parsimony) stromů s délkou 211 kroků s indexem konzistence (CI) 0,801 a indexem retence (RI) 0,800 (obr. 20).

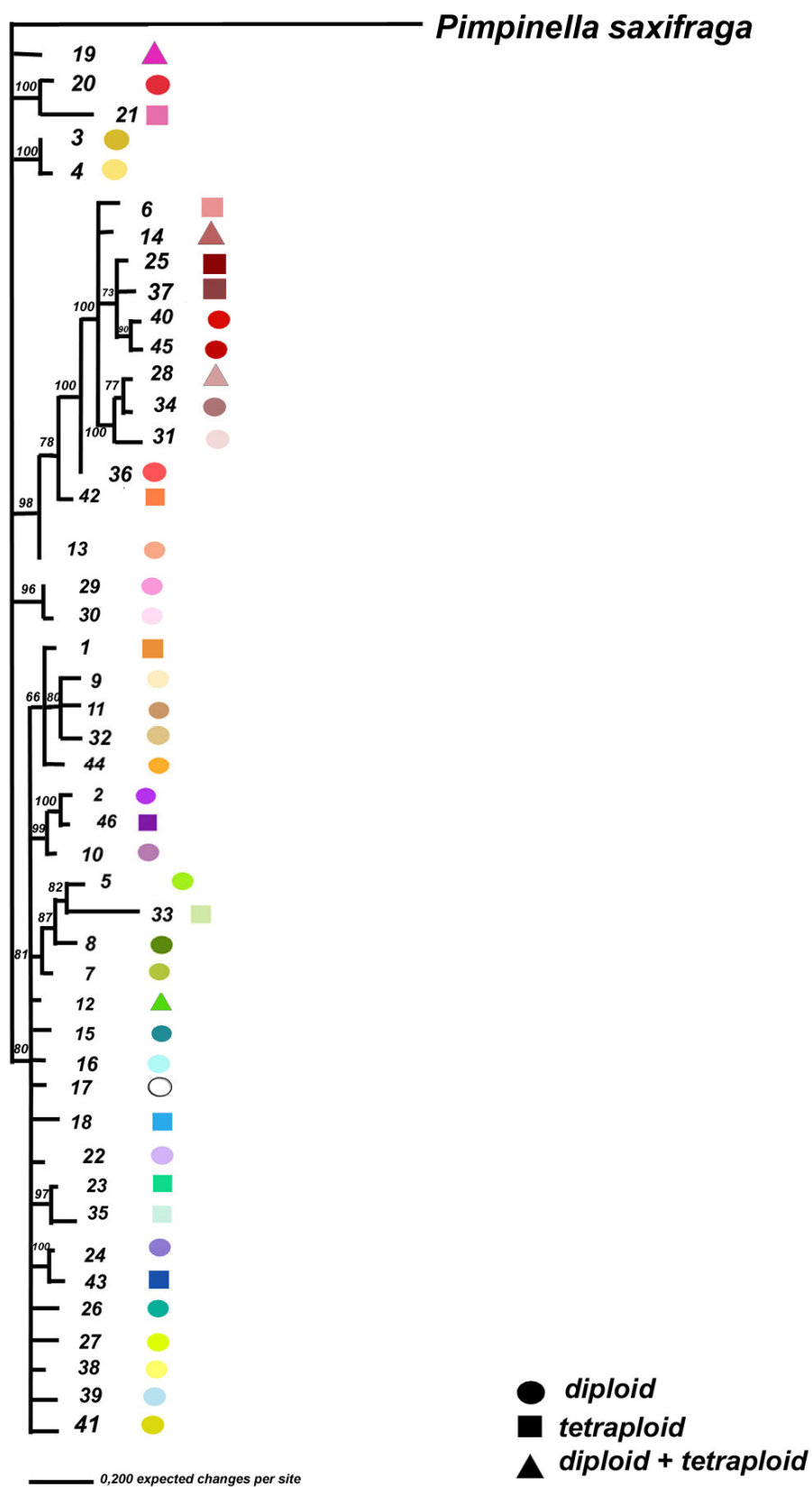
Pro Bayesovskou analýzu byl zvolen substituční model F81+I+G, nst=1 a evoluční model rates=invgamma navržený Hierarchicallikelihood ratio testem; parametry best fit modelu na základě Akaike information criterion jsou model HKY+I+G, nst=2, rates=invgamma. Strom je na obr. 21.

Celkem bylo rozlišeno 46 haplotypů, zahrnujících 1–6 vzorků (z max 70 vzorků).

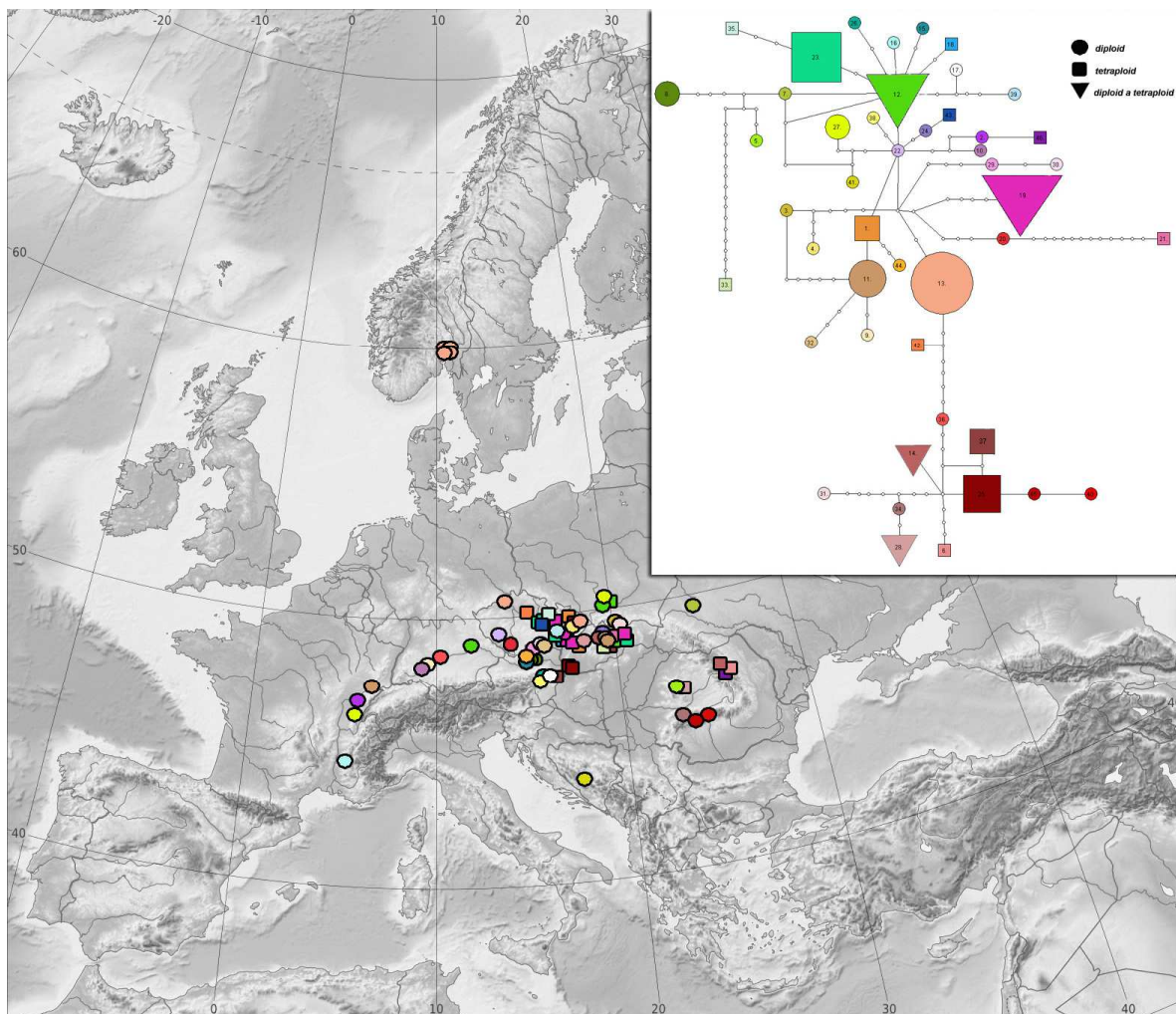
Za outgroup posloužil diploidní bedrník *Pimpinella saxifraga*, původně vybraný *Seseli osseum* měl haplotyp stejný jako některý haplotyp *Libanotis pyrenaica*.



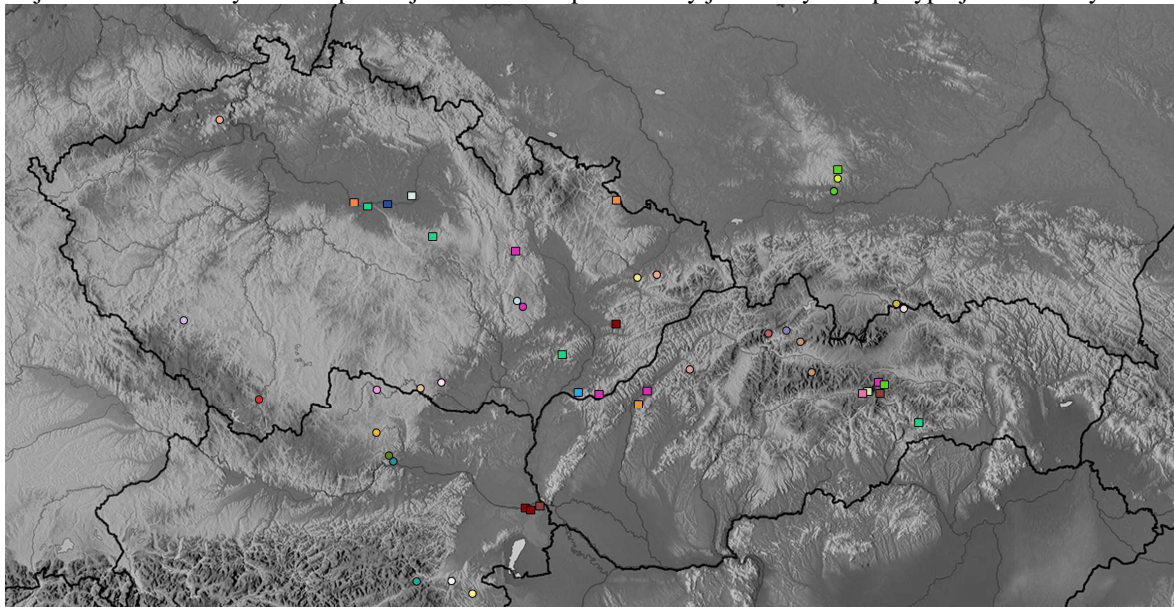
Obr. 20: Fylogenetická analýza *Libanotis pyrenaica* založená na spojených chloroplastových markerech trnF-trnL a cp018-cp020 vypočtená metodou MP; v uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu >50 %. Čísla haplotypů viz tabulka 2, odpovídají číslům v tcs síti v přílohách a na obr. 22 a mapám (obr. 22, 23).



Obr. 21: Fylogenetická analýza *Libanotis pyrenaica* založená na spojených chloroplastových markerech trnF-trnL a cp018-cp020 vypočtená Bayesovskou analýzou; v uzlech jsou uvedeny posteriorní pravděpodobnosti. Čísla haplotypů viz tabulka 2, odpovídají číslům v tcs síti v přílohách a na obr. 22 a mapám obr. 22, 23.



Obr. 22: Rozšíření haplotypů spojených chloroplastových úseků trnF-trnL a cp018-cp020 v Evropě s haplotypovou sítí TCS v pravém horním rohu. Kolečka vyznačují diploidní cytotyp, čtverečky tetraploidní, v případě, že byl stejný haplotyp nalezen u diploidního i tetraploidního cytotypu, je v síti zobrazen trojuhelníčkem. Barvy v síti odpovídají barvám v mapě. Lokality jednotlivých haplotypů jsou uvedeny v Tab. 2.



Obr. 23: Rozšíření haplotypů spojených chloroplastových úseků trnF-trnL a cp018-cp020 v ČR, na Slovensku a v sousedních územích. Haplotypová síť TCS v pravém horním rohu na předchozím obr. (22) nebo v obrazových přílohách. Kolečka vyznačují diploidní cytotyp, čtverečky tetraploidní. Barvy v síti odpovídají barvám v mapě. Lokality jednotlivých haplotypů jsou uvedeny v Tab. 2.

3.4. Diskuse

Naměřená absolutní velikost genomu diploidního cytotypu *Libanotis pyrenaica* mi vyšla průměrně 2,77 pg (plus minus směrodatná odchylka 0,11), což se shoduje s udávanou velikostí v literatuře (Schwarzová 2012). Nejmenší hodnota byla zjištěna u rostliny z rakouského hradu Buchenstein ($2C = 2,592$ pg), největší z německého Mausbachu ($2C = 3,14$ pg).

Relativní velikost genomu u diploidních rostlin mi vyšla 2,9 pg plus minus směrodatná odchylka 0,12. V měřených vzorcích se nacházely rostliny od velikosti 2,26 do velikosti 3,37 pg. Rostlina s nejmenší relativní velikostí genomu pocházela z Ukrajiny z Frahy – dalo by se spekulovat, nejedná-li se již o jiný východnější druh; pak ji následovaly rostliny (s velikostí genomu cca 2,7 pg) z Norska a také česká populace ze Šipky (což pěkně koresponduje s chloroplastovými úseky, které tyto rostliny daly do stejného haplotypu – jen populace z Milešovky už měla genom spíše normální velikosti). Největší diploidní genom byl zaznamenán při měření populace z rakouského hradu Dobra – 3,37 pg. Jednalo se o tři rostliny z 10, zbylé měly relativní velikost genomu průměrně 2,85 pg. Předpokládám, že se tedy bude jednat o rostliny s jinak velkým genomem, možná aneuploidy. Literatura udává i $2n = 26$ (Reduron 2008), což se v tomto případě také nabízí za vysvětlení. Na triploidní rostlinu má genom ještě příliš malý.

Dle mého měření rostliny z Českého Krumlova a okolí měly relativní velikost genomu 3,14 pg (viz obr. 12c). Nutno poznamenat, že odtud také pocházejí rostliny spočítané do Květeny ČR jako diploidní, proto bych se přikláněla k tomu, že velikost genomu diploidních rostlin se bude skutečně pohybovat v širším rozmezí.

Tetraploidní rostliny se spočítanými chromozomy pocházejí z rakouského Altenburgu východně od Vídně, kde bylo zjištěno $2n = 4x = 44$ (Vítek et al. 1992). Mnou změřené rostliny z této populace se pohybovaly kolem 4,97–5,1 pg, tedy průměrně relativní velikost genomu měli 5,01 pg.

Zjištěná relativní velikost genomu všech měřených tetraploidních rostlin se pohybovala v rozmezí 4,98–5,89 pg. Rostlina s nejmenší velikostí pocházela z rakouských Hainburských vrchů (Altenburg, u nádraží, tedy snad z lokality, odkud byly spočítané chromozomy).

Průměrná velikost tetraploidní velikosti genomu je 5,367 pg. Největší relativní velikost genomu byla zjištěna u rostlin z Čertoryjí.

Nejmenší absolutní velikost genomu tetraploidní rostliny jsem zjistila ze vzorků

z Přelouče (4,9 pg), největší měla rostlina z Belianských Tater – Tatranské Kotliny (5,87 pg). Průměrná absolutní velikost genomu byla 5,236 pg. To je poněkud vyšší číslo, než uvádí Schwarzová (2008) - 4,99 pg (na základě rostlin z tří populací bez uvedeného množství skutečně změřených rostlin). Moje měření tedy vycházejí o něco vyšší, což může být způsobeno variabilitou v genomu, chybou nebo stářím některých analyzovaných rostlin.

Spekuluje se, že velikost genomu má také vliv na výslednou životní strategii rostliny. Rostliny s menším genomem bývají spíše jednoleté, rostliny s větším naopak víceleté až vytrvalé. Vzhledem k následujícímu pozorování (viz morfometrika) by se dalo zvažovat, že mírný vliv bude znát i v tomto případě – některé, častěji tetraploidní, rostliny po odpození přežívají i do dalšího roku (viz dále).

Smíšená populace z polských Kobylan obsahovala diploidní rostliny s absolutní velikostí genomu 2,77 pg a tetraploidní s velikostí 5,22–5,4 pg. Jestli se tedy jedná o tetraploidy vzniklé na místě, anebo zavlečené odjinud se nedá s jistotou soudit. Autotetraploid by měl mít velikost genomu cca 5,54 pg. Podobné velikosti genomu se ale nacházejí i v nedalekých tetraploidních populacích v Ojcowském NP.

Rozdíly ve velikosti genomu byly ale zjištěny i v rámci jediné populace, častěji u diploidních populací. Nejvýraznější rozdílnost asi byla zaznamenána v rámci populace na lokalitě Šipka u Štramberka, na hradě Dobra v Rakousku, v Českém Krumlově (viz histogram obr. 12c) i blízkých Nových Dobrkovicích, v Hnanicích nebo v Horních Věstonicích na Moravě. Opět se může jednat např. o aneuploidii.

Literatura o polyploidii v čeledi Apiaceae většinou mlčí. Jestli je to způsobeno přílišnou složitostí, opomíjením anebo jestli je polyploidie v této čeledi opravdu tak vzácná se dá zjistit leda analyzováním dalších a dalších rostlin. Z literární rešerše Schwarzová (2012) se dozvídáme o aneuploidních počtech pro celou řadu rostlin z čeledě Apiaceae, např. pro *Aegopodium podagraria* ($2n = 22, 38, 39, 42, 44$), *Anthriscus sylvestris* $2n = 16, 32, 48$ (jednou zaznamenané i B-chromozomy), *Apium graveolens* $2n = 21, 22, 23$, *Astrantia major* $2n = 14, 18$; *Berula erecta* taktéž se zjištěnými B-chromozomy, jinak s chromozomovými počty $2n = 12, 18, 22$. Je tedy možné, že v čeledi je aneuploidie častá, což by vysvětlovalo poměrně velké rozdíly mezi mnou naměřenými velikostmi genomu.

Při určování ploidie (resp. DNA ploidie) jsem se přidržela lokalit, kde byly v minulosti na této rostlině chromozomy počítány (Vítek et al. 1992, Slavík & Tomšovic 1997) a přes ně jsem přistupovala k dalším lokalitám.

Je možné, že se mi v měřeních mohl ztratit i triploidní jedinec (ten by se měl ale nejspíš pohybovat cca kolem 4,3 pg). Takto velkého jedince jsem v žádném měření nezaznamenala.

Lze tedy říci, že během screeningu jsem sice odhalila různé nepravidelnosti ve velikosti genomu, ale nenalezla jsem žádnou triploidní rostlinu. To může být způsobené jednak tím, že se zřejmě oba cytotypy příliš nepotkávají a když už, zřejmě budou mít vyvinuté dobré prezygotické mechanismy (např. dřívější kvetení jedné ploidie, jiný opylovač atp.).

Rozšíření cytotypů

Diploidní rostliny se v České republice nacházejí zejména v jižních Čechách, v Českém středohoří a na několika lokalitách na Moravě. Tetraploidní cytotyp je v České republice častější v nížinných oblastech, ale vyskytuje se i na některých hradech a hradních zříceninách. Na Slovensku se tetraploidní cytotyp vyskytuje i ve vyšší nadmořské výšce než u nás.

Lze předpokládat, že se u nás jako původní vyskytují oba cytotypy. Ne všechny tetraploidní populace jsou velké a invazní, na druhou stranu i některé diploidní populace jsou velmi početné (např. na jižní Moravě na vinici Šobes nebo v Hnanicích).

V literatuře se hojně píše o výskytu *L. pyrenaica* v Českém středohoří, celkovou revizi oblasti jsem ale z časových důvodů neudělala. Mohu jen konstatovat, že diploidní populace na Milešově spíše jen přežívá. Další lokalita *L. pyrenaica* by měla být v Čertově jizbě u Brně (K. Nepraš, ústní sdělení) a dle literatury snad (alespoň v minulosti) i na Borči, Kletečné, Lipské hoře, Želenickém vrchu, Milé a zavlečená v Lovosicích (Kroufek 2012).

Na několika literárně udávaných místech (viz obr. 11 a příloha tab. 1 a 2) jsme rostlinu neobjevili. V některých případech se může jednat o pouhé nenalezení, nebo o zánik původně příhodného biotopu například zastíněním, mohlo se jednat také o přechodný výskyt (např. nová navážka cesty), nebo záměnu za jiný druh (hlavně v databázi Fldok (www 15) zřejmě často zaměňována za *Pimpinella saxifraga*).

Rozšíření obou cytotypů na Slovensku je téměř vikariantní. Diploidní cytotyp byl zjištěn na středním Slovensku, zejména na Malé Fatře, Velké Fatře, v Chočských vrších, Nízkých Tatrách a v pohořích lemujících z východu střední Pováží. Tetraploidi byli potvrzeni v antropicky značně ovlivněném údolí Váhu mezi Dubnicí a Novým Mestom, zejména pak ale téměř souvisle ve východní části vnitřního karpatského oblouku jižně od Váhu a Hornádu a v přilehlých výběžcích Panonské nížiny.

V Rakousku jsem zjistila jak diploidy, tak tetraploidy, což se shoduje s literaturou (Vitek et al. 1992). I zde platilo, že tetraploidní populace byly spíše v teplé nížině, na rozdíl od diploidních, které jsem obecně nacházela častěji a v různých nadmořských výškách (viz obr. 24). Tetraploidní populace byly zjištěny v Podunají východně od Vídně, vesměs na sekundárních biotopech (podél silnic a v blízkosti sídel); *L. pyrenaica* (podle všeho

tetraploidní cytotyp) se v tomto území v poslední době velmi rychle šíří a začíná tvořit rozsáhlé početné populace. Diploidní populace se vyskytují na hradních zříceninách v Českém masívu a v Alpách (Bucklige Welt).

Z Polska jsou zahrnuty pouze sběry z vápencových skal v Ojcowském NP a z Kobylan v okolí Krakova a potom téměř z hranice se Slovenskem – z polských Pienin, ze Tří korun (diploid). Kobylany se ukázaly jako jediná smíšená populace (objevil F. Kolář) obou cytotypů. Převládal diploidní cytotyp, jen na malém úseku se vyskytoval krom diploida i tetraploid. Na triploida jsme tam ale nenarazili (zde sebráno a cytometricky analyzováno 60 rostlin). Obecně se dá říct, že dle množství cytometrovaných rostlin v této smíšené populaci vychází asi na poměr 6 diploidních:1 tetraploidní. Ve skutečnosti se ale tetraploidní rostliny nenacházely průběžně v celém údolí, ale jen na jediném skalnatém výstupu (GPS souřadnice N50 09.371 E19 45.411). V okolí Kobylan se pak vyskytuje diploidní i tetraploidní cytotyp. Mohlo by se jednat o tetraploidní rostliny sem sekundárně rozšířené snad ze vsi Skala - spolu s vybavením horolezců – nejspíš zachycením semen na lanech či v batožině. Zajímavé by bylo pozorování populace v delším časovém rámci. Podobná kontaktní zóna obou ploidí se dá očekávat i v Ojcowě, ačkoliv během této studie nebyla nalezena.

Z Německa se mi podařilo získat pouze diploidní rostliny z Francké Jury, Švábské Alby, Mohansko-franské plošiny [celkem 9 lokalit a jedna z Kaulsdorfu (obr. 13), tato rostlina ale měla výrazně větší genom než ostatní diploidní rostliny, na cytometru se překrývala se standardem a bylo nutné použít za standard *Solanum*. Z populace jsem měla pouze jedinou rostlinu, navíc ve vegetativním stavu a nedá se s jistotou vyloučit, že se nejedná o jiný druh]; stejně jako jsme přivezli jen diploidy z francouzského Předalpí (francouzská Jura, Massif de la Chartreuse, Vercors); ve Francii sebrán materiál z osmi lokalit, všechno diploidy, viz obr. 7).

Bohužel se mi nepodařilo získat více lokalit ze severnější Evropy či přímořské oblasti. Víme jen, že v okolí Osla (F. Kolář) roste zřejmě výhradně diploidní cytotyp.

Na jih Evropy jsem také nezavítala. Nejjižnější lokalita pochází z Chorvatska a jedná se o tetraploidní cytotyp (do této doby nebyl z této oblasti udáván).

V Rumunsku pocházejí všechny sběry z Karpat a rozšíření ploidí vykazuje velmi zajímavý pattern – ve Východních Karpatech byl zjištěn pouze tetraploidní cytotyp, zatímco v Jižních Karpatech pouze cytotyp diploidní. Oba cytotypy pak byly prokázány v rumunských Západních Karpatech; tetraploidní populace (asi padesát rostlin) se přitom nacházela na skalkách podél silnice na zrušené zarostlé železnici. Je tedy potenciálně možné, že se sem tento cytotyp dostal odjinud ještě v době existence tratě.

Další a jediný sběr z Maďarska pochází z Aggteleckého krasu (tetraploid), ale opět jde o rostliny sbírané u silnice. Ani odtud nebyl ale tetraploidní cytotyp udáván.

Diploidi byli nalezeni také ve Slovinsku a dvě populace jsem získala z Ukrajiny (P. Mráz, F. Krahulec).

Při pohledu na rozšíření obou cytotypů se zdá, že snad na západě bude převládat diploidní cytotyp, ve střední Evropě se již objevují oba a snad výskyt tetraploidního cytotypu bude směřovat i více na východ. (Z literatury je tetraploidní cytotyp udáván z oblasti Minsku v Bělorusku).

Haplotypy

Celkem se vylišilo 46 haplotypů po spojení obou chloroplastových úseků (tedy cp1+cp2; viz obr. 20, 21, 22, 23).

Získané fylogenetické stromy jsou nerozlišené, obsahující polytomie. Podpořená je ale linie zahrnující haplotypy 6, 14, 25, 28, 31, 34, 36, 37, 40, 42, 45, tj. jak diploidní tak i tetraploidní rostliny z Rumunska (6, 14, 28 tetraploidní populace z Karpat – Mts. Ceahlau, Muntii Bistritei, Muntele Mare: 34, 40, 45 diploidní populace z Karpat – Muntii Șureanu, Cozia – Capatiny, Munții Căpățanii), Rakouska (25, 37 – tetraploidní populace z Podunají blízko Hainburských vrchů), Slovenska (diploidní populace z Malé Fatry – 14, 28 – tetraploidní Nízké Tatry, 31- diploidní Pieniny, 37 – tetraploidní rostlina ze Slovenského ráje (Dobšiná - Stratená), dvou lokalit z České republiky (25 - tetraploidní populace v Hostýnských vrších na ruině Lukova, 42 - tetraploidní u Kolína) a jedné z Německa – ze Švábské Alby (skalky pod zříceninou Maisenburg). Celkově se tedy dá říci, že se jedná o skupinu, jejíž jádro snad pochází z Karpat a jen vyznívá do České republiky a Německa. Dále jsou podpořeny skupiny zahrnující haplotypy 3+4 tedy polské Pieniny (2x) a Starý Jičín v ČR (2x), 20+21 diploidní Český Krumlov a tetraploidní populace ze slovenských Nízkých Tater (naproti ústí Trsteníku do Hronu), 29+30 diploidní cytotypy na rakouském hradě Buchenstein a českém Lapikusu ve Znojenské kotlině, 24+43 diploidní rostliny na Oravském hradu (SR) a české tetraploidní populace Řečan nad Labem, 2+46+10 francouzská lokalita diploidních rostlin na skále u mostu Ponte Diablo v Juře (Alpách), rumunská diploidní populace rostlin z Bicaz Chei (Karpaty) – první dvě by snad mohly spojoval lokalitu, v nichž byly nalezené – a to velké rokle; německá diploidní lokalita Gutenstein ze švábské Alby sice také rostla na vápencových skalách ale podél silnice. Haplotypy 29 a 30 jsou vcelku blízké lokality, navíc obě hradní, takže lze předpokládat jak přirozený výskyt tak i vliv člověka.

Zvláštní je podpora 24+43, která spojuje diploidní populaci turisticky oblíbeného Oravského hradu na Slovensku s šířící se tetraploidní populací v Polabí.

Zajímavé je, že norské populace sdílí stejný haplotyp s populacemi na Milešovce v Českém středohoří a na Šipce na Moravě. Mohlo by se jednat o rozšířenější haplotyp, který by potenciálně mohl mít nějakou souvislost s kontinentálním zaledněním ve čtvrtohorách. Celkově se zdá, že ve střední Evropě nejspíš docházelo skutečně k několika různým migracím z různých směrů. Snad by se dalo také uvažovat o skupině karpatských haplotypů. Naproti tomu rostliny z Předalpí se rozpadly do mnoha haplotypů, které jsou často promíchány s těmi ve střední Evropě.

Hrady a hradní zříceniny

Hradní zříceniny jsou unikátním biotopem, který mnohdy nahrazuje mizející přirozené biotopy některým vzácným rostlinám (např. *Arabis nemorensis*, *Asplenium trichomanes* subsp. *pachyrachis* nebo např. *Artemisia scoparia*). Často na nich roste i *L. pyrenaica*, a to diploidní i tetraploidní cytotyp. V České republice se diploidní cytotyp vyskytuje např. v jižních Čechách – ruiny hradů Rábí, Velešín, a snad by se sem dal zahrnout i výskyt v Českém Krumlově, hrad Landštejn, dále na Moravě Nový Hrádek u Lukova v Podyjí, zřícenina hradu Lapikus na Znojemsku, pod zříceninou Nový Hrad v Horních Věstonicích, ruiny hradu Holštejn nebo Starý Jičín. Tetraploidní rostliny na hradech jsem v České republice našla jen na Moravě a ve Slezsku, a to na hradech Cvilín (u Krnova v Nížkém Jeseníku), Cimburk (u Koryčan) a Lukov v Hostýnských vrchách. Na Slovensku jsem našla na hradech převážně tetraploidní cytotypy – v Pováží na hradu Trenčín, v Cеровské vrchovině na hradu Fiľakovo a na osamoceném kopci s hradem Krásna Hôrka u Rožňavy. Diploidní populace je jen na Oravském hradě. Podobně je tomu v Rakousku, na všech navštívených hradech byl pouze diploidní cytotyp.

Migrační historie

Migrační historie druhu se na základě použitých chloroplastů zcela nevyjasnila, ale na základě TCS sítí i získaných fylogenetických stromů lze tvrdit, že tetraploidní cytotyp je polytopního původu.

Teoreticky by bylo možné, že by např. haplotyp z okolí Hainburských vrchů mohl odpovídat tomu na hradě Lukově kvůli průchodu vojsk za třicetileté války (obrovské množství lidí, koní, zbroje, velká šance přenesení semen i na velkou vzdálenost). Tato

myšlenka by potřebovala podrobnou historickou revizi, zjistit, kudy přesně se vojska ubírala a kde všude se zastavila.

Zajímavá je také haplotypová skupina č. 23 (hrad Cimburk, Krásná Hôrka na Slovensku, Záboří nad Labem, a snad i lokalita v Mikšově lese v Železných horách) do níž spadají oblasti, kde se člověk hojně vyskytoval v době románské a snad i dříve; jedná se o tetraploidní cytotyp u všech analyzovaných vzorků. Vysvětlením tohoto rozšíření by také mohla být souvislost s državami Matyáše Korvína. Například by bylo možné, že se daný haplotyp nacházel na hradě Krásná Hôrka, odkud se rozšířil během uherských válek i na dobytý hrad Cimburk a později až na Pardubicko, odkud se mohl rozšířit do Mikšova lesa v Železných horách.

Zjistila jsem, že diploidní cytotyp se často vyskytuje na minerálně bohatších substrátech (obvykle na vápenci, ale i dalších horninách, např. na spraši). Dále se vyskytuje na suchých loukách a skalkách, často na hradních zříceninách. Tetraploidní cytotyp roste na podobných stanovištích, ale často na antropicky ovlivněných. Lze ho najít na vápenatém podloží, často ale podél silnic v příkopech. Dalo by se tedy zvažovat, jestli nemá nějaký vliv např. i zasolování.

Jiná možnost by byla, že jsou tetraploidi vázaní spíše na „neskalní“ typ biotopu, což by teoreticky mohlo souviset s jinými ekologickými nároky cytotypů. Obecně rostou tetraploidi spíše na sekundárních stanovištích; častěji jsem ho vídala v suchých trávnicích a prosvětlených lemech. Bylo by možné, že tetraploidní cytotyp roste spíše na zarostlejších místech a že by byl např. konkurenčně schopnější než diploidní jedinec (to by také mohlo souviset s pozorovanou strategií růstu – spíš keřovitý habitat, který se nedá tak snadno vystrnadit jiným druhem). Teoreticky by se také dalo zvažovat, jestli není tetraploidní cytotyp odolnější vůči kosení a pastvě.

Z rozšíření *Libanotis pyrenaica* se tedy nedá určit jednoznačný geografický pattern jako u jiných ploidně diferencovaných druhů (například *Tripleurospermum inodorum* s kontinentálním tetraploidním cytotypem a diploidním ve Velké Británii a v severní části Francie (Kay 1969); *Cardamine amara* s tetraploidním cytotypem v centrální Itálii a v Alpách – subsp. *austriaca* zasahující až na naše území – a s diploidním cytotypem rozšířeným ve zbytku areálu (Krásná 2008); nebo rozšíření u *Centaurea phrygia*, kdy se diploidní cytotyp vyskytuje na většině areálu, oproti tetraploidnímu vyskytujícímu se výhradně v Západních Karpatech, Hrubém Jeseníku a na několika přilehlých lokalitách). Podobně nejasně geograficky segregované ploidie jako u mnou studovaného druhu byly nalezeny u příbuzného

druhu *Pimpinella saxifraga* (Mozolová 2007). V tomto případě se sice nacházely i smíšené populace, jednotlivé cytotypy byly ale i v nich odděleny v rámci mikrostanoviště.

V literatuře se také často hovoří o závislosti ploidie s nadmořskou výškou. Já jsem shledala tetraploidní cytotyp spíše nížinným. K podobnému závěru došli Husband & Schemske (1998) u *Epilobium angustifolium*, častěji se ale v literatuře setkáváme spíše s opačně výškově rozloženými ploidie (např. Krásná 2008).

3.5. Morfometrika

3.5.1. Měření pěstovaných rostlin

3.5.1.1 Metodika

Morfometrická analýza představuje pouze doplňkovou část této studie; tomu odpovídá i počet studovaných rostlin a způsob zpracování dat.

Morfologické znaky (celkem 11, Tab. 4) byly měřeny/zjišťovány na 37 diploidních a 33 tetraploidních rostlinách pěstovaných na Experimentální zahradě Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích, vypěstovaných ze semen ze stejného stáří z šesti lokalit – tří diploidních (Dobrkovice, Hnanice, Český Krumlov) a z tří tetraploidních populací (Přelouč, Řečany, Chvaletice).

Tabulka 4: Proměřované morfologické znaky.

název znaku	popis znaku (upřesnění)	jednotka
počet obalů	počet listenů v terminálním okolíku	
počet okolíčků	počet okolíčků v terminálním okolíku	
počet obalíčků	počet listenů v jednom krajním okolíčku terminálního květenství	
výška rostliny	od báze k terminálnímu květu v době jeho květu	cm
počet okolíčků	celkový počet květenství na rostlině	
délka listu	délka nejhornějšího listu bazální růžice v době květu	cm
šířka listu	šířka nejhornějšího listu bazální růžice v době květu rostliny	cm
celkem laloků	počet laloků na pravé straně čepele při položení listu lícem vzhůru a to na nejdolnějším jařmu, nikoliv na listu v křížovém postavení (ty nemusejí mít všichni jedinci vyvinuté)	
počet zubů	celkový počet zubů na výše popsaném laloku listu	
počet jařem	počet jařem listu (dokud je znatelné oddělení listové čepele od řapíku)	
počet větví	počet větví odbočujících z hlavní lodyhy	

Od dalších vybraných znaků jsem musela vzhledem k neuskutečnitelnosti ustoupit. - Byly to znaky: vykrojení (zub) na okvětních lístcích paprskujících květů (záleželo na

čerstvosti/vyschlosti květů, nebylo možné je lepit, aby byl zub vidět, neboť vzniká naopak přebytkem pletiva okvětních lístku a ne jeho nedostatkem).

Původně zamýšlené měření délek tyčinek jsem také opustila, protože jsem zjistila, že v jednom květu je vyvrátá obvykle maximálně právě jedna. Navíc tyčinková fáze na hlavním okolíku trvala přibližně pět dní (v závislosti na počasí a množství okolíčků). Tyčinka v květu vydržela maximálně den, než opadávala.

V počtech žeber na lodyze se rostliny liší stejně jako v barvě a odění.

Původně jsem chtěla také počítat množství květů v okolíčku, měřit šířku a délku okvětních lístků na pěti květech z krajního kruhu okolíčků (nakonec měřeno jen na pár jedincích a proto dále nezahrnuto), délku paprsku okolíčku – nakonec znak vyřazen, neboť je délka velmi variabilní v závislosti na fázi kvetení (prodlužuje se).

Jsem si vědoma, že by morfometrika potřebovala proměřit více jedinců a považuji toto měření jen za nástin či za pilotní studii. Během souběžného křížícího experimentu nebylo možné změřit ani více květů, které v letošním abnormálně teplém roce odkvétaly přespříliš rychle.

Rostlinu jsem měřila svinovacím metrem, listy pásmem.

Popisné statistiky a t-testy byly počítány v programu STATISTICA 8 (StatSoft Inc.), odtud také byly získány některé grafy.

Ke zjištění celkové struktury dat byla použita ordinační metoda PCA v programu Past (Hammer viz www.14). Analýza hlavních komponent (PCA) provádí lineární transformace původních znaků na nové, nekorelované proměnné (hlavní komponenty). Jejich charakteristikou je míra její variability (rozptylu).

Pozorování

Nejprve rostlině vyrostly děložní lístky, následovaly bazální ještě nečleněné a pak nové, nejčastěji vyrostl list, který měl právě o jedno jařmo více než poslední vyrostlý. Bohužel jsem to neshledala pravidlem - některé rostliny měly i více listů se stejným počtem jařem. Na stranu druhou jsem za celou dobu pokusu ani jednou nezaznamenala, že by se počet jařem v průběhu růstu snižoval. Tak například rostlina, která vytvořila list s pěti jařmi již zřejmě není z nějakých fyziologických příčin schopna vytvořit list s pouhými třemi.

Jedinci vyrostlí ze semen ze stejné populace se od sebe také mnohdy lišily. Nejen v

odění, v barvě řapíku (občas nafialovělé) či listové plochy (různé odstíny zelené), ale i ve velikosti a tvaru úkrojků. Některé rostliny působily jemnějším „kapradovitým” dojmem, jiné robustním. To všechno jen potvrzuje obrovskou morfologickou variabilitu tohoto rostlinného druhu.

3.5.1.2 Výsledky

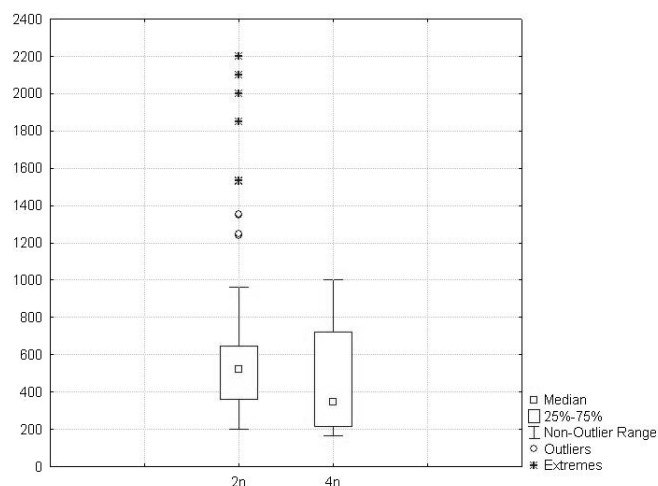
Tab. 5: Diploidi a tetraploidi se statisticky významně lišily ve všech sledovaných znacích kromě počtu okolíků a délky listu a nevýznamně i v šířce listu. Jako nejlepší ze sledovaných znaků se jeví výška rostliny, počet obalů a okolíků, či počet zubů, jařem a počet obalíčků.

ploidie		počet obalů	počet okolíků	počet obalíčků	výška rostliny	počet okolíků	délka listu	šířka listu	celkem laloků	počet zubů	počet ařem	počet větví
diploid	min	3	18	12	128	16	29	12	5	0	8	12
	max	21	70	20	236	116	65	38,5	13	52	30	36
	průměr	10,527	41,919	15,27	180,73	55,919	47,149	28,103	9,189	11,757	11,081	22,784
	směrodatná odchylka	4,281	10,202	1,94	22,798	25,234	6,692	5,119	2,026	11,034	3,506	6,152
tetraploid	min	1	21	11	55	12	35,5	13	2	0	7	9
	max	14	44	16	200	145	57	37,5	11	14	12	28
	průměr	7,379	32,515	13,03	119,788	58,121	45,773	24,658	6,606	2,727	8,97	18,818
	směrodatná odchylka	3,107	5,821	1,141	34,433	38,555	6,151	6,756	1,906	3,038	1,337	5,189
t-test	t-value	3,435	4,594	5,714	8,689	-0,281	0,879	2,385	5,399	4,484	3,208	2,855
	p	0,001	0,000	0,000	0,000	0,779	0,382	0,199	0,000	0,000	0,002	0,006

Dle pozorování diploidní rostliny tvořily během života hlavně prvním rokem spíše méně listů a delších, tetraploidní rostliny naopak spíše menší listy ale daleko více.

Z naměřených hodnot (viz obr. 27 a 28) je zajímavé, že diploidní rostliny skutečně byly výrazně vyšší než tetraploidní (průměrná výška zkoumaných diploidních rostlin byla 180 cm, tetraploidních jen 119 cm), tetraploidní na stranu druhou mívají zkrácené nody, takže se liší v celkovém habitatu. Toto platilo pro rostliny pěstované, ale ve volné přírodě se mohou chovat jinak – v terénu zatím neověřeno.

Z naměřených hodnot je zajímavé, že diploidní rostliny tvořily více květních větví, ale tetraploidní rostliny naopak tvořily spíše více okolíků (statisticky ovšem neprůkazné). Diploidní rostliny převyšovaly tetraploidy téměř ve všech měřených znacích (v počtech obalů,



Obr. 24: Diploidní a tetraploidní cytotyp v závislosti na nadmořské výšce (v m n.m.).

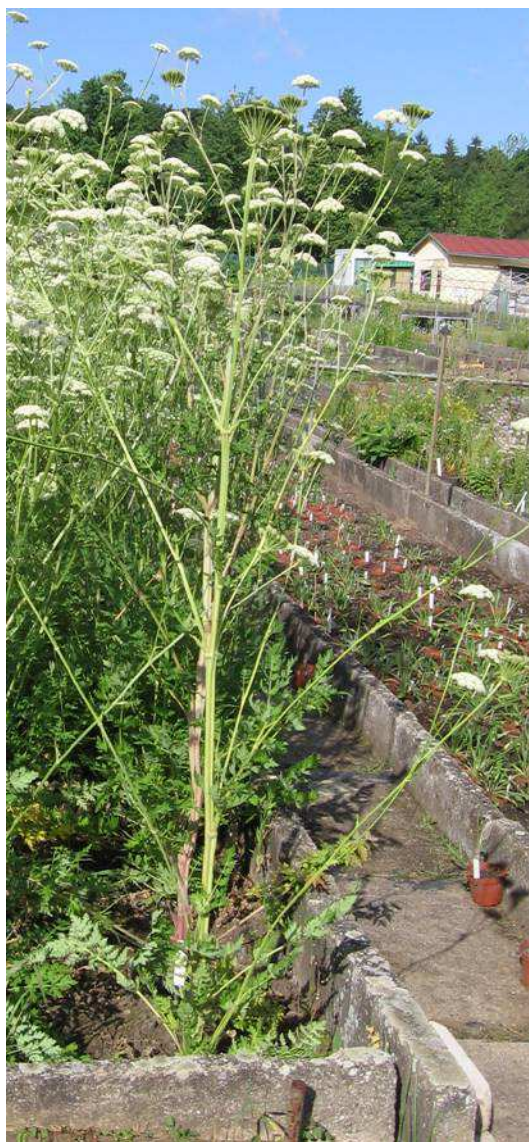
obalíčků, počtu listových laloků i zubů). Další znaky na listech se ale neukázaly výrazněji odlišné.

V PCA diagramu diploidní a tetraploidní rostliny sice netvoří oddělené shluky, přesto mají tendenci se oddělovat podle první osy (obr. 29).

Doplňující poznámky k pěstovaným rostlinám (pěstované ze semen, viz výše) – vlastní pozorování

Nejprve klíčící rostlinka vytvořila jednoduché děložní lístky, potom lístky podobající se mladému libečku a až později vytvořily listy členěné a s jařmy. Počet jařem na listech se postupně zvyšuje (lze předpokládat, že rostliny s více jařmy budou starší, ale rozhodně to neplatí). Až v červenci na některých rostlinách usychaly málo dělené lístky, které se vytvořily jako první po děložních. Na zimu listy zasychají a zjara raší nové. Ze starých listů zůstává na bázi rostliny čupřina odumřelých vláken.

V druhém roce od června začaly kvést a některým jedincům to vydrželo na postranních větvích až téměř do konce roku. (Obecně vykvétaly dříve tetraploidní rostliny a také jim dříve dozrávala semena). Vykvetly a odplodily všechny rostliny. Ze sedmdesáti dvou rostlin



Obr. 25: Diploidní cytotyp *L. pyrenaica* na pokusné zahradě AVČR na Chotobuzi tvořil dlouhou vytáhlou lodyhu, volně větvenou do stran („koště“).

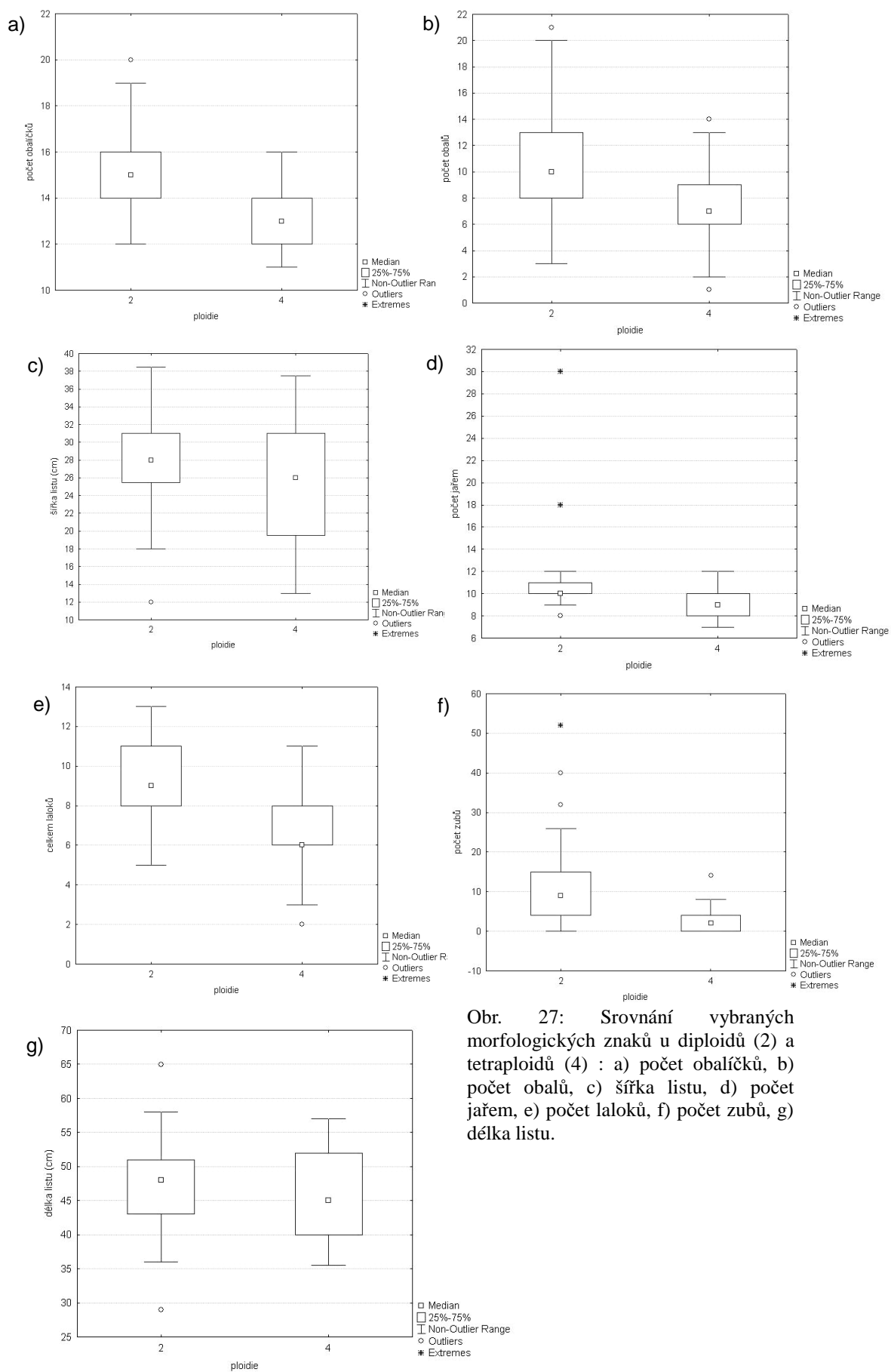


Obr. 26: Tetraploidní cytotyp *L. pyrenaica*, pěstovaný v pokusné zahradě AVČR na Chotobuzi tvořil spíše hustý kompaktní trs („křoví“).

nakonec na jaře dalšího roku obrazilo deset rostlin, přičemž se jednalo o osum tetraploidních rostlin a dvě diploidní; zdá se tedy že zejména tetraploidní rostliny nejsou výhradně monokarpické. Tetraploidní rostliny (obr. 26) měly celkově kompaktnější habitus („křoví“) a diploidní (obr. 25) spíše vytáhlé vzhůru, často větvené – někdy jen jakoby do dvou stran, jindy na všechny („koště“). Tetraploidní cytotyp svým charakterem růstu na mne působí, že by byl schopen i vegetativního množení po rozříznutí trsu, narozdíl od diploidního cytotypu, který mívá na bázi jednoduchou lodyhu.

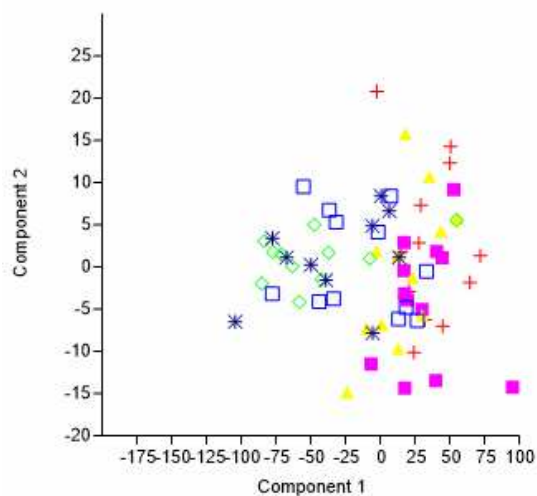
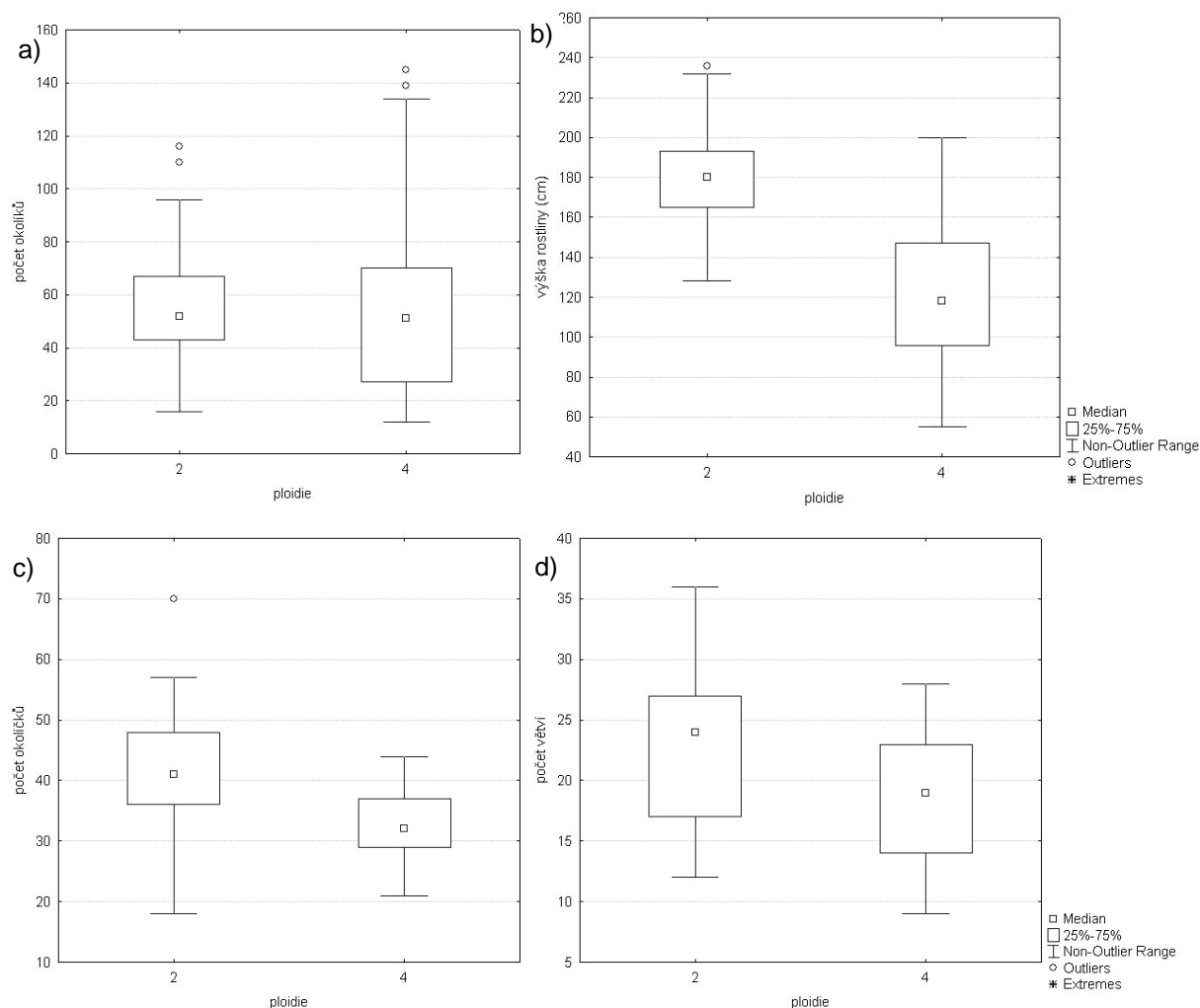
Rostliny vyrostlé ze semen ze stejné populace se od sebe také mnohdy lišily. Nejen v odění, v barvě řapíku (občas nafialovělé) či listové plochy (různé odstíny zelené), ale i ve velikosti a tvaru listových úkrojků. Některé rostliny působily jemnějším „kapradovitým“ dojmem, jiné robustním. To všechno jen potvrzuje obrovskou morfologickou variabilitu tohoto druhu.

Dle pozorování diploidní rostliny tvořily během života hlavně prvním rokem spíše méně listů a delších, tetraploidní rostliny naopak spíše menší listy ale daleko více.



Obr. 27: Srovnání vybraných morfologických znaků u diploidů (2) a tetraploidů (4) : a) počet obalíčků, b) počet obalů, c) šířka listu, d) počet jařem, e) počet laloků, f) počet zubů, g) délka listu.

Obr. 28: Srovnání vybraných morfologických znaků u diploidů (2) a tetraploidů (4) : a) Počet okolíků, b) výška rostliny v cm, c) počet okolíčků v terminálním okolíku, d) počet květonosných větví.



Obr. 29: : PCA na základě měření 11 znaků u 70 rostlin *Libanotis pyrenaica*. První osa vysvětluje 60.956 % variability, druhá 31.177 % variability.

Diploidní cytotyp studené barvy (Dobrkovice – červená, Hnanice – fialová, Český Krumlov – žlutá), tetraploidní cytotyp teplé barvy (Přelouč – zelená, Řečany – tmavě modrá, Chvaletice – světle modrá).

3.5.1.3. Diskuze

Zdá se, že diploidní cytotyp investuje více do růstu (více větví, větší výška rostliny a snad i množství jařem) naproti tetraploidnímu, který investuje zejména do množství okolíků, což by mohlo mít také za následek jeho potenciální expanzivnost. Krom toho byly sledovány dva typy habitatu – vysoký rozvolněný diploid a zhuštěný tetraploid (zatím neověřeno v terénu). Diploidní cytotyp by tak měl výhodu v místech, kde se nemusí bát konkurence o prostor. Navíc se semena z takové rostliny nejspíš mohou šířit opravdu na velké vzdálenosti, obzvlášť, když vezmeme v úvahu nějaký slunný skalnatý biotop, kde se tato rostlina obvykle nachází. Naproti tomu tetraploidní cytotyp se jevil jako kompaktní trs, který bude nejspíš schopný slušné kompetice o místo a tudíž by se spíše mohl vyskytovat na loukách, trávnicích atp. Jeho zkrácení nodů by pak mohlo mít i pozitivní vliv při případné disturbanci (kosení, okus), což by teoreticky také mohlo vysvětlovat jako výskyt. Nejspíš se budou oba cytotypy také odlišovat v disperzní schopnosti. Většina semen tetraploidní rostliny nejspíše spadne přímo pod mateřskou rostlinu, teoreticky by se tu dalo zvažovat i o nurse efektu, pokud budou mladé semenáčky vyrůstat kryté před nepříznivými podmínkami pod odumřelou rostlinou. Jiná možnost je, že by tyto dva typy habitatů mohly preferovat jiný způsob šíření semen (diploidní např. větrem, staré rostliny se pak i často lámou či vyvrací a do určité míry mohou připomenout například stepní běžce), narozdíl od pevně zakotvených tetraploidů, kteří rozprsknou svá semínka do okolí třeba po nárazu do větví od zvěře. To by vysvětlovalo, proč se tetraploidní cytotyp snadno šíří podél vodních toků, kolejí či navigací.

3.5.2 Merikarpia

Obecně se předpokládá, že tetraploidní rostliny kvůli většímu genomu musí mít větší jádra a tedy nejspíš i samotné buňky. Tato souvislost byla již mnohokrát komentována u velikosti pylových zrn různých rostlin (např. *Pimpinella saxifraga*, Mozolová 2007). Kromě velikosti pylových zrn by se ale mělo jednat také o velikost semen.

Čeď *Apiaceae* tvoří z každého květu dvě merikarpia nesena karpoforem (dohromady tvoří tzv. schizofor). Obecně se od sebe merikarpia mezi jednotlivými druhy poměrně dostli liší a proto také na jejich morfometrické a později i anatomické stavbě bylo po dlouhou dobu založeno členění čeledi.

Za znaky se obvykle považují jednak samotný tvar, žebra, pokryv, přítomnost či nepřítomnost pozůstatku čnělky a její délka či směřování, ale také množství cévních svazků, jejich rozmístění a šířka jednotlivých pletiv.

3.5.2.1 Metodika

Merikarpia bývají jemě plstnatá až chlupatá, někdy trochu olysávající – což bude znak nejspíš proměnný v závislosti na stáří semene a možná i na lokálních podmínkách, navíc vcelku subjektivní, pokud se člověk nerozhodne počítat přímo množství chlupů na daný úsek anebo se nepodívá na jejich stavbu.

Jako nejsnadnější a nejvyužitelnější případně i v terénu či nad herbářovými položkami se mi proto zdálo podívat se pouze na velikost semen.

Všechna merikarpia byla nasbíraná náhodně z terminálních okolíků diploidních a tetraploidních rostlin a měřena digitální šuplerou. Jednalo se opět o semena z diploidních (Dobrkovice, Hnanice, Český Krumlov) a tetraploidních (Přelouč, Řečany, Chvaletice) populací.

Výsledky byly zpracovány v programu Statistika (StatSoft Inc.).

Celkově jsem změřila 991 merikarpií, z toho 588 diploidních a 403 tetraploidních.

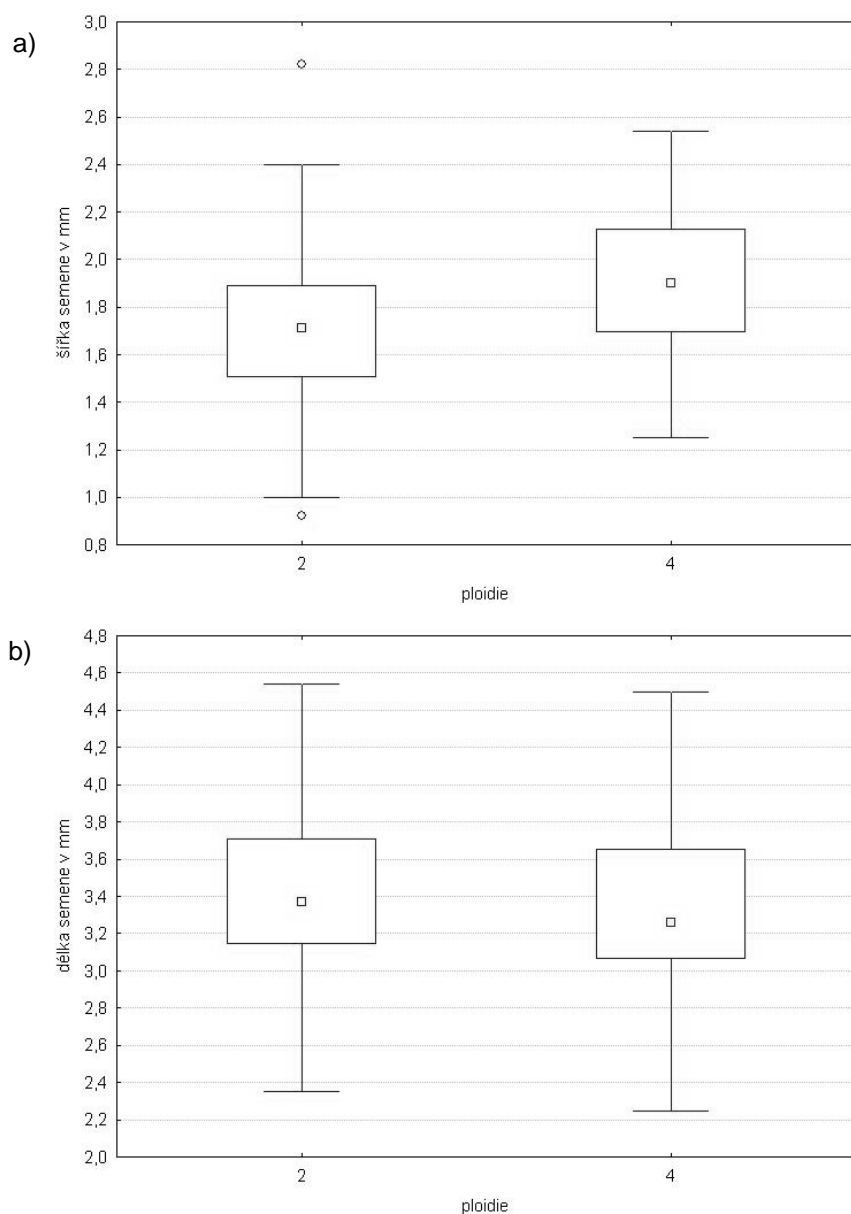
3.5.2.2 Výsledky

Diploidní i tetraploidní rostliny tvoří merikarpia plus minus stejně dlouhá, ale zdá se, že by se oba cytotypy mohly lišit na základě jejich šířky (tab.6).

Diploidní cytotyp tvořil spíše semena úzká, tetraploidní spíše širší (viz obr. 30).

Tab. 6: Velikost semen z diploidních a tetraploidních rostlin.

ploidie		délka (mm)	šířka (mm)
diploid	min	2,35	0,92
	max	4,54	2,82
	průměr	3,434	1,695
	směrodatná odchylka	0,412	0,271
tetraploid	min	2,25	1,25
	max	4,5	2,54
	průměr	3,365	1,912
	směrodatná odchylka	0,444	0,268
t-test	t-value	2,508	-12,415
	p	0,012	0,000



Obr. 30: Box ploty na základě porovnání velikostí merikarpíí diploidních a tetraploidních rostlin. Krabice vyjadřuje 25% - 75% kvantily, a čtvereček značí medián. Graf a) šířka a b) délka semen diploidních (2 na ose x) a tetraploidních (4) rostlin v mm.

3.5.2.3 Diskuze

Semena rostlin čeledi Apiaceae obecně mívají velké množství endospermu a velmi malý zárodek. Lze se tedy domnívat, že diploidním rostlinám stačí méně živin a tudíž menší endosperm a šířka semene než tetraploidním, které by už zřejmě nedokázaly úspěšně vyklíčit a přežít s menším obsahem živných látek (a tudíž i menší šířkou semene).

Ačkoliv jsou dle pozorování tetraploidní rostliny zřejmě skutečně limitované minimální velikostí semene trochu výš než rostliny diploidní, což u jiných rostlin bylo již několikrát nastíněno (přesto se vyskytují i studie tuto závislost vyvracející např. Bretagnolle 1995), zřejmě nebude tento znak dobře použitelný v terénu. I diploidní rostliny jsou schopné tvořit

poměrně široká semena, mateřská rostlina totiž musí řešit, zda investovat víc do životaschopnosti jednotlivých semen či do jejich množství.

Nejspíš se dá jen konstatovat, že pokud člověk uvidí rostlinu s hodně úzkými semeny, může se pouze domnívat, že by se mohlo jednat spíše o diploidní cytotyp.



Obr. 31: Semena *Libanotis pyrenaica*.

4. Plovatelnost

V textu kapitoly je používán v podobných pokusech tradičně používaný termín „semena“, byť se jedná o plody/merikarpia.

4.1. Úvod

Způsob šíření semen/diaspor patří vedle množství produkováných semen, jejich morfologie, schopnosti přežít v semenné bance a klíčivosti k základním vlastnostem ovlivňujícím úspěšnost rostlin. O disperzní schopnosti *Libanotis pyrenaica* zatím není mnoho známé. Jongejans a Telenius (2001) se zabývali šířením diaspor větrem, Kiviniemi a Telenius (1998) epizoochorním šířením v srsti myšice lesní (*Apodemus flavicollis*). Vzhledem ke stanovištním vazbám zůstala zatím zcela opomíjena další možnost šíření – hydrochorie. Vzhledem k tomu, že alespoň v České republice se v poslední době expanzně šíří podél Labe (obdobná situace je na západním Slovensku podél Váhu nebo v severovýchodním Rakousku podél Dunaje), lze se domnívat, že právě šíření vodou může být jednou ze strategií šíření. To ale může hrát roli i v případě přirozeného výskytu na skalách a křovinatých stráních, pod kterými se často nachází koryto řeky, které vytváří přirozenou hranici a zároveň i koridor pro šíření druhů. Aby jej ale mohl rostlinný druh ke svému šíření využít, potřebuje mít pro to alespoň některé předpoklady, jichž může být široká škála. Může se jednat o rostliny, které se dobře vegetativně množí (např. mnohé vrby) a mohou se tak dostávat na další lokality po směru proudu, obvykle po povodních, které stromy a keře alespoň z části potrhají. Jiným příkladem mohou být rostliny, které využijí snížené konkurence na volných plochách obnažené půdy po sestupu hladiny anebo rostliny, které jsou schopné šířit své propagule volně na hladině či ve vodním sloupci.

K takovému šíření semen je ale nutný předpoklad, že se semena po nějakou dobu udrží na vodní hladině a neklesnou hned do substrátu (i když zrovna při povodních, kdy je přemísťováno velké množství půdy by mohl mít i význam padnout přímo na dno a tvořit tam semenou banku – pak je ovšem otázka, jak dlouho taková semena vydrží živá). Udržením se na hladině (plovatelností) se sice zabývá množství studií, zaměřených ale (vcelku pochopitelně) na vodní a pobřežní rostliny (např. van den Broek et al. 2005). Zatím pomíjené je také srovnání plovatelnosti různých cytotypů v rámci jednoho druhu, kde se právě *L. pyrenaica* zdá být velmi dobrým modelovým příkladem, zvláště s ohledem na to, že podle mých poznatků (viz kapitola 3.) se v okolí řek vyskytuje a rychle šíří téměř výhradně tetraploidní cytotyp.

4.2. Materiál a metodika

Semena byla sebrána v roce 2013 z populací Český Krumlov (2x), Dobrkovice (2x), Hnanice (2x), Chvaletice (4x), Přelouč (4x) a Řečany (4x); následně byla v roce 2015 sebrána semena z rostlin původem z týchž populací, tentokrát z rostlin pokusně pěstovaných v Experimentální zahradě BÚ AV ČR v Průhonicích, které byly překryty sáčky z organzy a opyleny rostlinou původem ze stejné populace (nebo pokud to nebylo umožněno vzhledem k době květu alespoň stejné ploidní úrovni) a lze tedy předpokládat, že takto sklizená semena se budou v mnohém podobat semenům z přírodní populace (z časových důvodů a nepřízní okolností nebylo možné nasbírat nová semena – např. na několika lokalitách v Polabí byly rostliny převážně pokoseny, jinde měl vliv nejspíš extrémně suchý a teplý rok). Semena byla vybrána náhodně z terminálních okolíků.

Dvě různá stáří semen jsem brala úmyslně, aby bylo možné porovnat různě vyschlá semena a prezentovat tak jak semena čerstvá, tak semena, která by potenciálně mohla na rostlině vydržet z předchozího roku (semena některým jedincům opadávají záhy po dozrání, jiným drží poměrně urputně). Lze předpokládat, že semena uložená v laboratorních podmínkách jsou vyschlá, budou do sebe déle sát vodu a pomaleji klesnou ke dnu. Zároveň by se dalo předpokládat, že tetraploidní semena by mohla být těžší a tudíž by mohla klesat ke dnu rychleji než ta diploidní, která se předpokládají menší. Krom hmotnosti a hustoty ale může záviset na různých vlastnostech jako je odění a povrch či tvar semen, což se mezi ploidemi různých druhů může také lišit.

Vzhledem ke zjištění, že semena zřejmě poměrně rychle ztrácejí klíčivost (viz kapitola 5) by takový pokus ale mohl být bezpředmětný i kdyby se ukázalo, že se semena na hladině udrží dlouho. Mohla by být už mrtvá a jejich schopnost dostat se na nová místa by nemohla zajistit vznik nové populace. Výsev semen po jejich vylovení jsem ale již nedělala.

Pro zjištění plovatelnosti semen již bylo navrženo mnoho různých metodik s různou technickou náročností (víření vody viz Coops 1995), i z tohoto důvodu se mi nejvíce hodila upravená metodika podle Lhotské (1968), která je v současnosti stále často užívána (např. Hroudová et al. 1997, Moravcová et al. 2010).

Použitá semena byla brána náhodně z terminálních okolíků. Vzala jsem 100 semen z každé populace a dala je do lahvíček na vzorky do destilované vody. Semena jsem míchala po 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 24; 32; 48; 56; 72 hodinách 1 minutu. Následně jsem spočítala, kolik

semen kleslo ke dnu. (Pokud semeno volně plavalo ve vodním sloupci, počítala jsem ho stejně, jako kdyby plavalo na hladině). Pro snadnější odečítání jsem měla čtyři nádoby po 25 semenech z každé populace (a každého stáří semen). Celkem jsem tedy použila 600 semen z diploidních rostlin a 600 semen z tetraploidních rostlin.

Stanoví se doba, za kterou klesne ke dnu 50 % a 100 % semen, hledala jsem závislost na dvou faktorech (stáří semen, 2 hladiny a ploidie, 2 hladiny, 2x a 4x) a jejich interakci. Výsledky byly zpracovány dvoucestnou analýzou variance (ANOVA) v programu R 3.2.5.

4.3 Výsledky

Počet plavajících/kleslých semen ke dnu byl odečítán celkem 11× v rozpětí 72 hodin, během této doby klesla ke dnu všechna semena (Tab. 7 a 8). Čas ve kterém klesne ke dnu 50 % semen nezávisí ani na plodii ($F=1.797$, $P=0.217$) ani na stáří semen ($F=1.335$, $P=0.281$), stejně tak čas ve kterém klesne ke dnu 100 % semen (plodie – $F=0.962$, $P=0.356$; stáří – $F=3.115$, $P=0.116$).

Grafy plovatelnosti jednotlivých populací viz obr. 32-35.

Tabulka 7: Množství starých semen kleslých na dno v závislosti na čase (v hodinách), diploidní populace (HNA, KRU, DOBR) a tetraploidní (PRE, REC, CHVA) populace.

Stará semena						
ČAS (h)	HNA	KRU	DOBR	PRE	REC	CHVA
0	0	0	0	0	0	0
0,5	2	43	17	49	35	22
1	15	54	25	60	55	48
2	47	59	36	66	65	61
4	64	67	47	74	75	77
6	70	76	50	78	83	84
8	74	88	63	83	97	86
24	80	97	93	96	99	97
32	86	97	95	99	99	99
48	97	100	99	100	99	100
56	99	100	100	100	99	100
72	100	100	100	100	100	100

Tabulka 8: Výsledky pozorování a: Množství nových semen kleslých na dno v závislosti na čase (v hodinách), diploidní populace (HNA, KRU, DOBR) a tetraploidní (PRE, REC, CHVA).

Nová semena						
ČAS (h)	HNA	KRU	DOBR	PRE	REC	CHVA
0	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	26	24	0	0
1	4	0	51	56	0	10
2	15	10	69	73	20	43
4	26	39	83	92	68	68
6	33	50	84	96	86	72
8	39	53	88	98	90	75
24	83	83	91	99	99	100
32	95	89	94	99	99	100
48	100	98	100	100	100	100
56	100	100	100	100	100	100
72	100	100	100	100	100	100

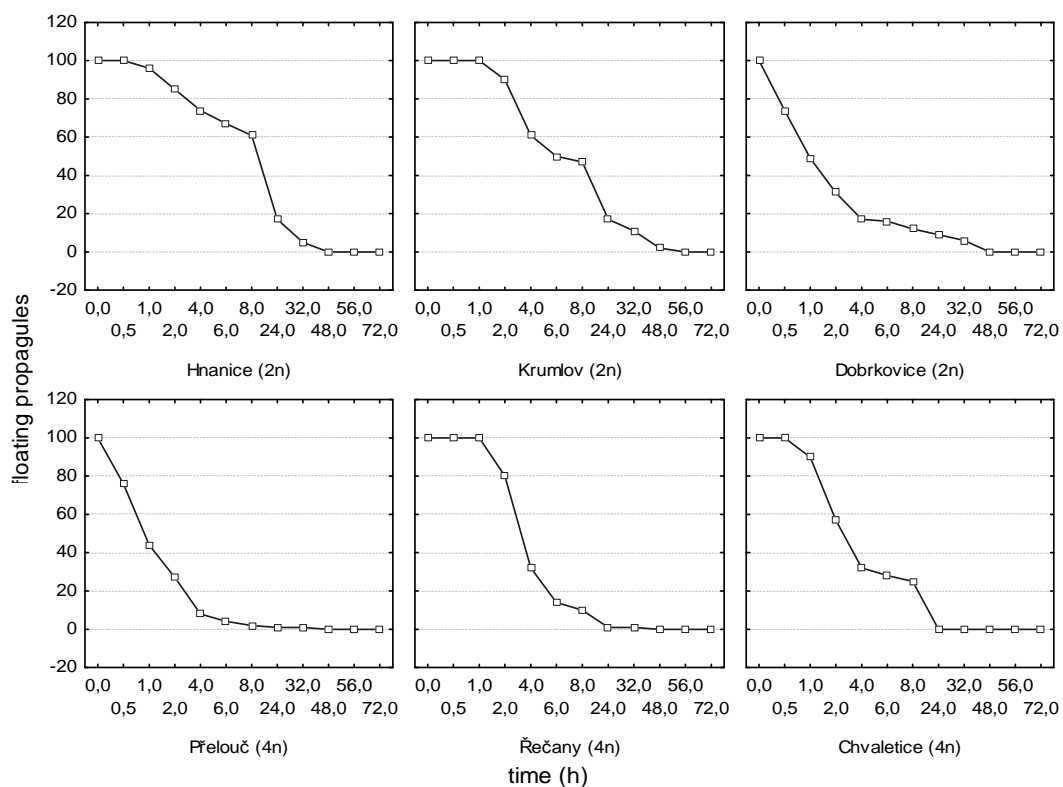
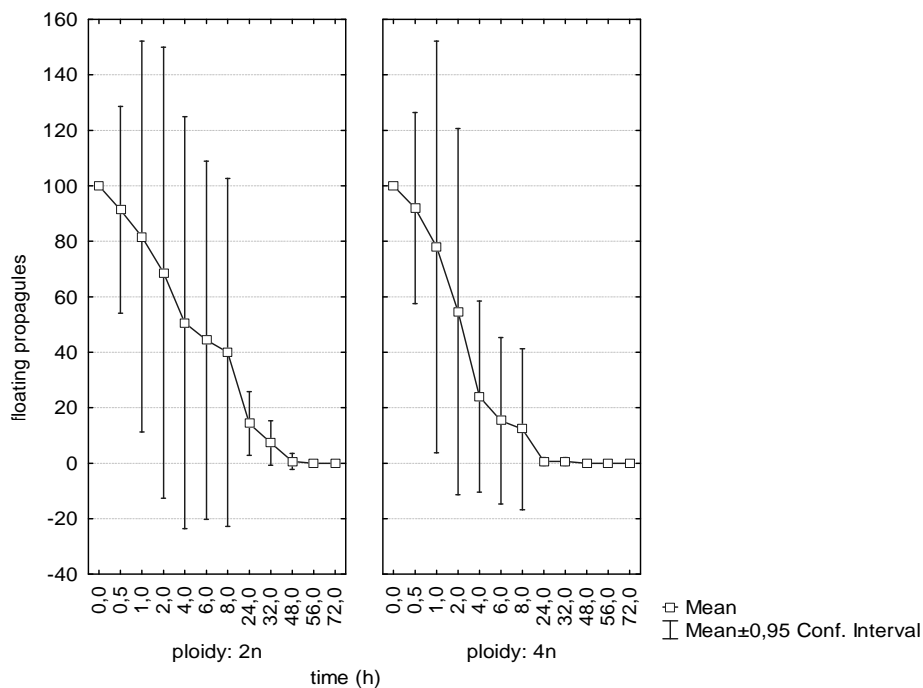
4.4 Diskuse

Stará semena šla ke dnu už i po půl hodině (nejméně ovšem populace z Hnanic). Diploidní semena klesala trochu pomaleji než tetraploidní v pokuse a i b. Stará semena měla tedy zpočátku větší propad než semena čerstvá, jednotlivá stará semena z různých populací na druhou stranu ale vydržela plavat déle než ta čerstvá.

Semena tetraploidních rostlin šla ke dnu rychleji a to u nových i starých semen. Zároveň ale stará semena klesala ke dnu mnohem dříve v první polovině času, ale některá jednotlivá semena se držela déle na hladině než u semen čerstvých. Také jsem zjistila, že záleží i na lokalitě, z níž semena pocházejí. Po půl hodině šla ke dnu semena z diploidních Dobrkovic i tetraploidní Přelouče (pokus b) mnohem dříve než z ostatních populací. Mohl by to být důsledek odění, tvaru semen, jejich velikosti či hmotnosti.

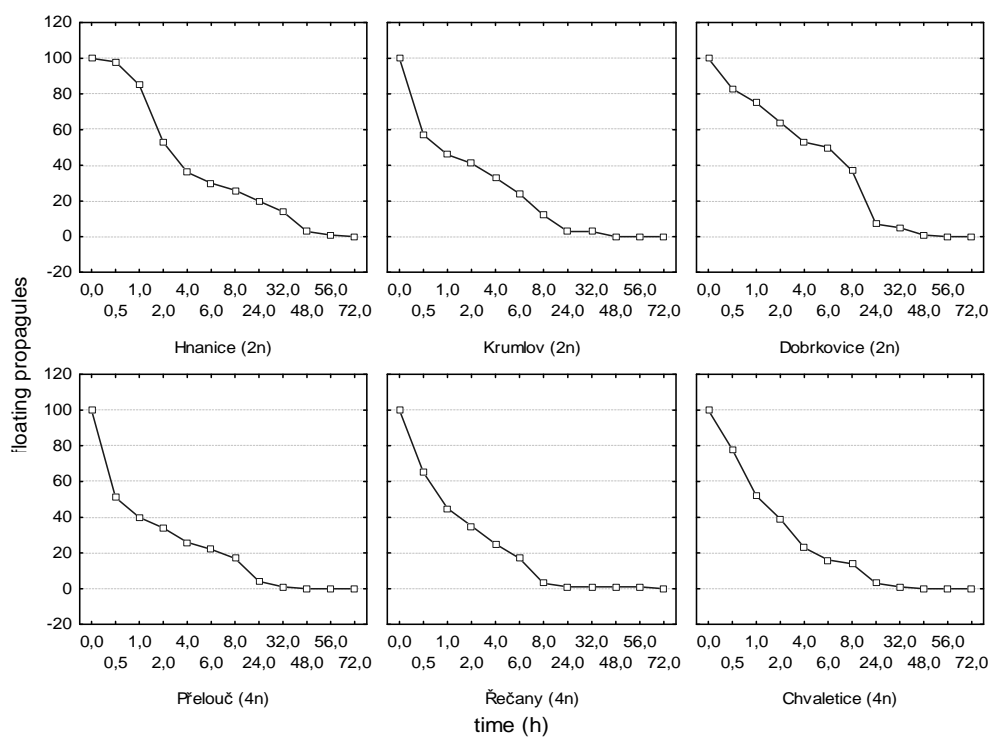
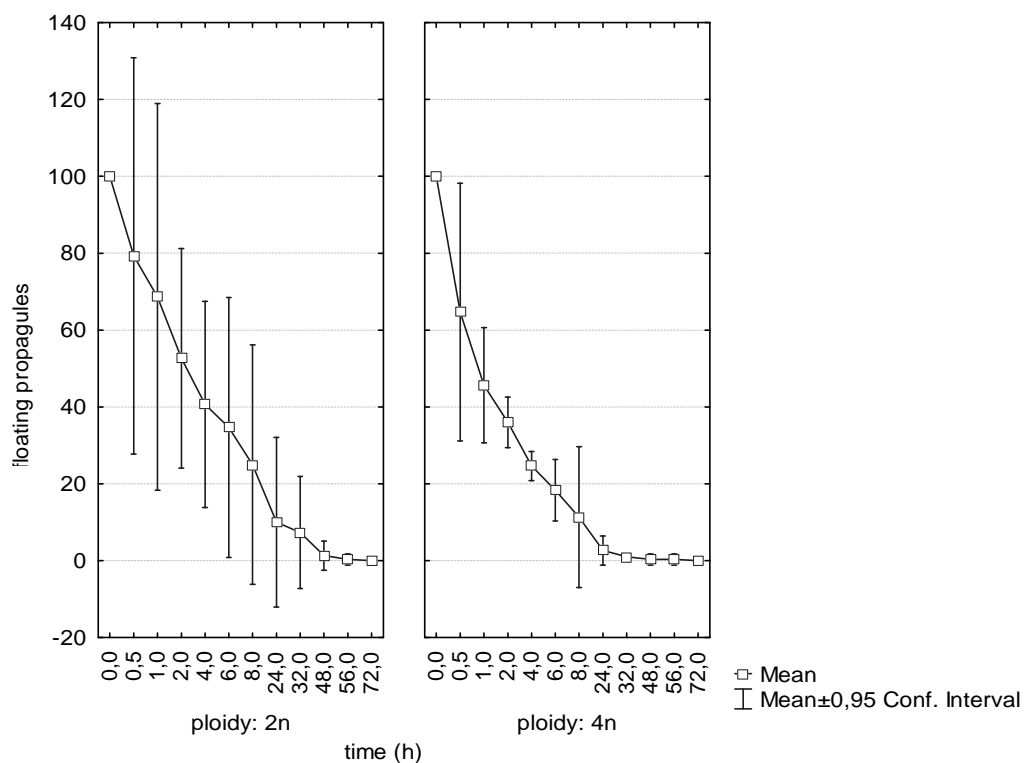
Dá se tedy říci, že za šířením se tetraploidního cytotypu podél velkých řek nestojí lepší plovatelnost semen.

Obr. 32: Množství semen plujících na hladině v závislosti na čase. Čerstvá semena (nestarší dvou měsíců). Diploidní (2n) vs. tetraploidní (4n) populace.



Obr. 33: Graf plovatelnosti čerstvých semen. Na ose x čas v hodinách, na ose y množství plovoucích semen. Jednotlivé populace se od sebe liší víc než samotné ploidní úrovně. Celkově ale tetraploidi padaly ke dnu dříve.

Obr. 34: Graf množství semen plujících na hladině v závislosti na čase - stará semena .
Diploidní (2n) vs. tetraploidní (4n) populace.



Obr. 35: Plovatelnost starých semen.

5. Klíčení semen v experimentálních podmínkách

Rozdíly ve velikosti genomu mohou mít vliv i na rychlost růstu a klíčení semen. Všeobecně se uvádí, že diploidní rostliny rostou rychleji než tetraploidní (díky rychleji proběhlému dělení buněk s menší velikostí genomu, stačí méně živin atp.). Zároveň se často setkáváme s různými cytotypy na místech klimaticky odlišných. Kromě vlhkosti a množství živin či pH, hraje velkou roli jistě i teplota. V současnosti se ale pořád ví o rozdílnosti v klíčivosti diploidních a tetraploidních semen příliš málo. Hlavním cílem tohoto faktoriálně uspořádaného pokusu bylo zjistit vliv tří faktorů – teploty, plodie a stratifikace – na klíčivost semen v *ex situ* experimentálních podmínkách.

5.1 Metodika

Semena byla sebrána na podzim roku 2012 ze tří diploidních (Hnanice na Moravě, Český Krumlov a Dobrkovice) a ze tří tetraploidních populací (Řečany, Přelouč a Chvaletice).

Pokus 1

Vybrala jsem plná semena, která jsem na deset minut ponořila do roztoku hypermanganu (semena jsou nesmáčivá, kvůli žebrům a oddělení si udržují vrstvičku vzduchu díky níž by plavala na hladině – je nutné dostatečně míchat). Z každé populace jsem brala dohromady 300 semen, která jsem náhodně rozdělila na tři části po sto semenech a ta jsem rozdělila po 25 do čtyř Petriho misek na vlhký filtrační papír. Tyto misky jsem umístila do tří klíčících boxů s rozdílnými denními a nočními teplotami (15/5°C, 20/5°C, 25/10°C) v budově Botanického ústavu AV ČR na Chotobuzi, takže v každém klimaboxu bylo nakonec po 4 miskách (dohromady 100 semen) za každou z šesti použitých lokalit. Klíčící semena byla počítána vždy v pondělí, středu a v pátek. První semena začala klíčit 6 až 7 dní po výsevu. Výsev proběhl 30.10. 2013, první semena začla klíčit zřejmě 5-6.11., první počítání semen jsme udělali 7.11. Pokus jsme ukončili 20. 12.2013. Následně byla semena podélně rozříznuta a obarvena TTC (triphenyl tetrazolium chlorid). Podle obarvenosti jsme zjistili, kolik jich je ještě živých.

Pokus 2

Opět jsem vybrala plná semena a po smočení v hypermanganu jsem jich 300 z každé populace uložila do lednice do Petriho misek, jejichž dno jsem vysypala jemným akvarijním pískem pro udržení vlhkosti a ten jsem opět překryla filtračními papíry s rozloženými semeny.

Semena byla stratifikována pět měsíců v teplotě 4°C, následně přenesena na nové filtrační papíry a klíčena stejným způsobem (ve třech klíčících boxech 15/5°C, 20/5°C, 25/10°C). Klíčení probíhalo od 17.3.2014 (výsev). Vybrané klíčící rostlinky byly přesazeny do sadbovače (27.3. 2014), a ponechány ve skleníku.

Pokusy byly ukončeny 3.4.2014 po 3 dnech neklíčení.

Vliv teploty a ploidie na klíčivost semen byl testován zobecněným lineárním modelem se smíšenými efekty a binomickým rozdělením fitovaným maximální pravděpodobností ['glmerMod'] s využitím statistického balíku lme4 v programu R, samostatně pro dataset klíčení bez stratifikace (pokus 1) a se stratifikací (pokus 2). Doba nutná k vyklíčení 50 % semen byla testována trojcestnou analýzou variance pro celkový dataset, faktory plodie (2x, 4x), teplota (3 režimy, viz výše) a stratifikace (ano-ne).

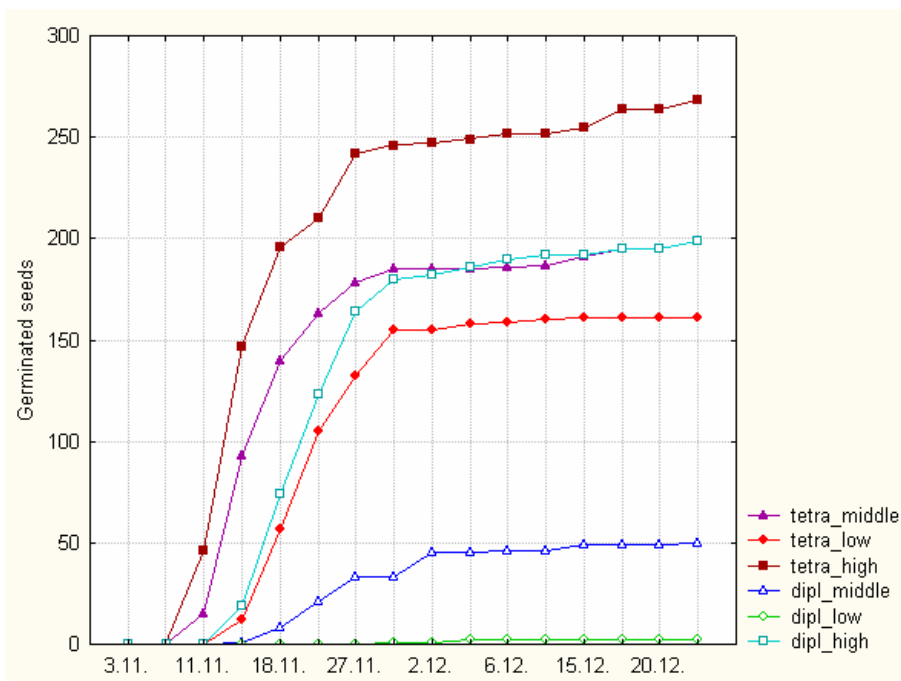
5.2 Výsledky

Při analýze celkového datasetu bylo prokázáno, že všechny zahrnuté faktory (teplota, ploidie, stratifikace) i jejich interakce mají vliv na dobu kdy vyklíčí 50 % semen. Tetraploidní semena klíčí lépe než diploidní, semena klíčí lépe při vyšší teplotě a po stratifikaci (viz tabulka 10).

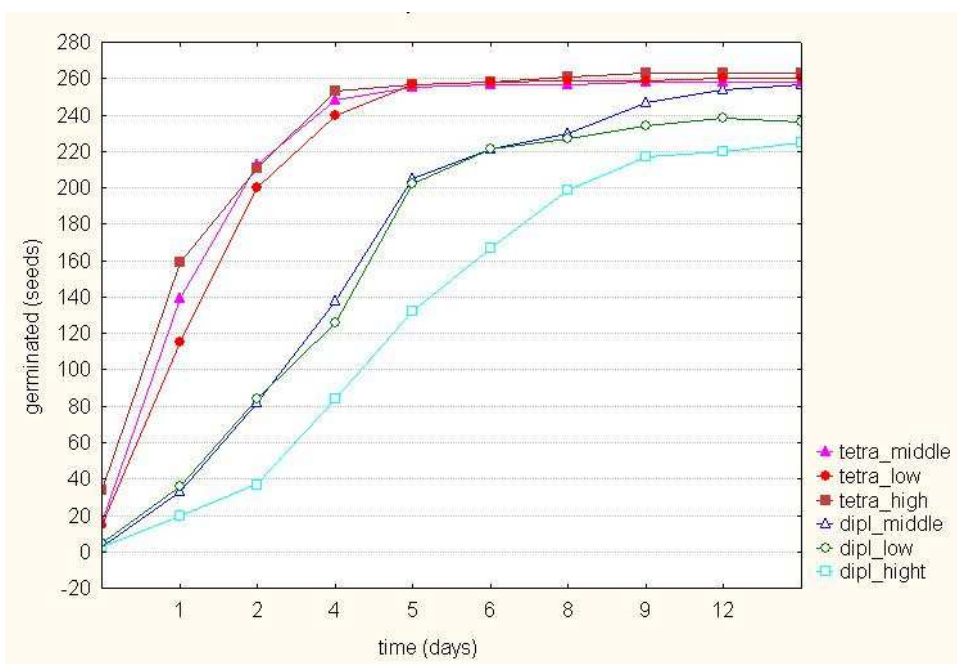
Tabulka 9: Efekt ploidie, teploty, stratifikace a interakcí těchto faktorů na dobu potřebnou k vyklíčení 50 % semen *Libanotis pyrenaica* v experimentálních podmínkách.

faktor	F	P
ploidie	181,258	<0,001 ***
teplota	44,969	<0,001 ***
stratifikace	319,275	<0,001 ***
ploidie:teplota	4,829	0,009 **
ploidie:stratifikace	19,316	<0,001 ***
teplota:stratifikace	49,229	<0,001 ***
ploidie:teplota:stratifikace	8,590	<0,001 ***

Při samostatné analýze datasetu klíčení po stratifikaci (GLM) byl prokázán vliv ploidie ($P < 0,001$) i teploty ($P < 0,001$) na klíčivost, současně se klíčivost cytotypů mění s teplotou ($P < 0,001$). Stejně tak byl prokázán signifikantní vliv těchto faktorů při analýze datasetu klíčení bez stratifikace.



Obr. 36: Graf dynamiky klíčení diploidních a tetraploidních populací v různých denních a nočních teplotách (low - 15/5°C, middle - 20/5°C, high - 25/10°C). Barevně odlišené různé ploidie v závislosti na teplotě. Tetraploidní - červená, fialová, modrá barva; diploidní tmavomodrá, světle modrá a zelená. Z grafu je zřejmé, že diploidní populace klíčily méně a později než tetraploidní. Obecně klíčila semena nejlépe v nejvyšší teplotě a nejméně v nejnižší.



Obr. 37: Graf závislosti klíčení diploidních a tetraploidních semen po stratifikaci na teplotě. Na ose x jsou dny, na ose y počet semen – celkem použito 300 semen z každé populace. Byly klíčeny ve třech rozdílných teplotách – čtvereček 25°C/10°C, trojúhelníček 20°C/5°C, kolečko 15°C/5°C. Červené barvy jsou semena z tetraploidní populace, modrozelené z diploidních populací. Počítání začalo ob den po výsevu.

Z grafu (obr. 36) je zřejmé, že tetraploidní semena klíčila dříve a ve větším množství. Nejvíce v nejvyšší teplotě, méně v nižších, ale víceméně vyrovnaně. Narozdíl od méně klíčivých semen z diploidních populací, které výrazně méně klíčily v nejnižší teplotě.

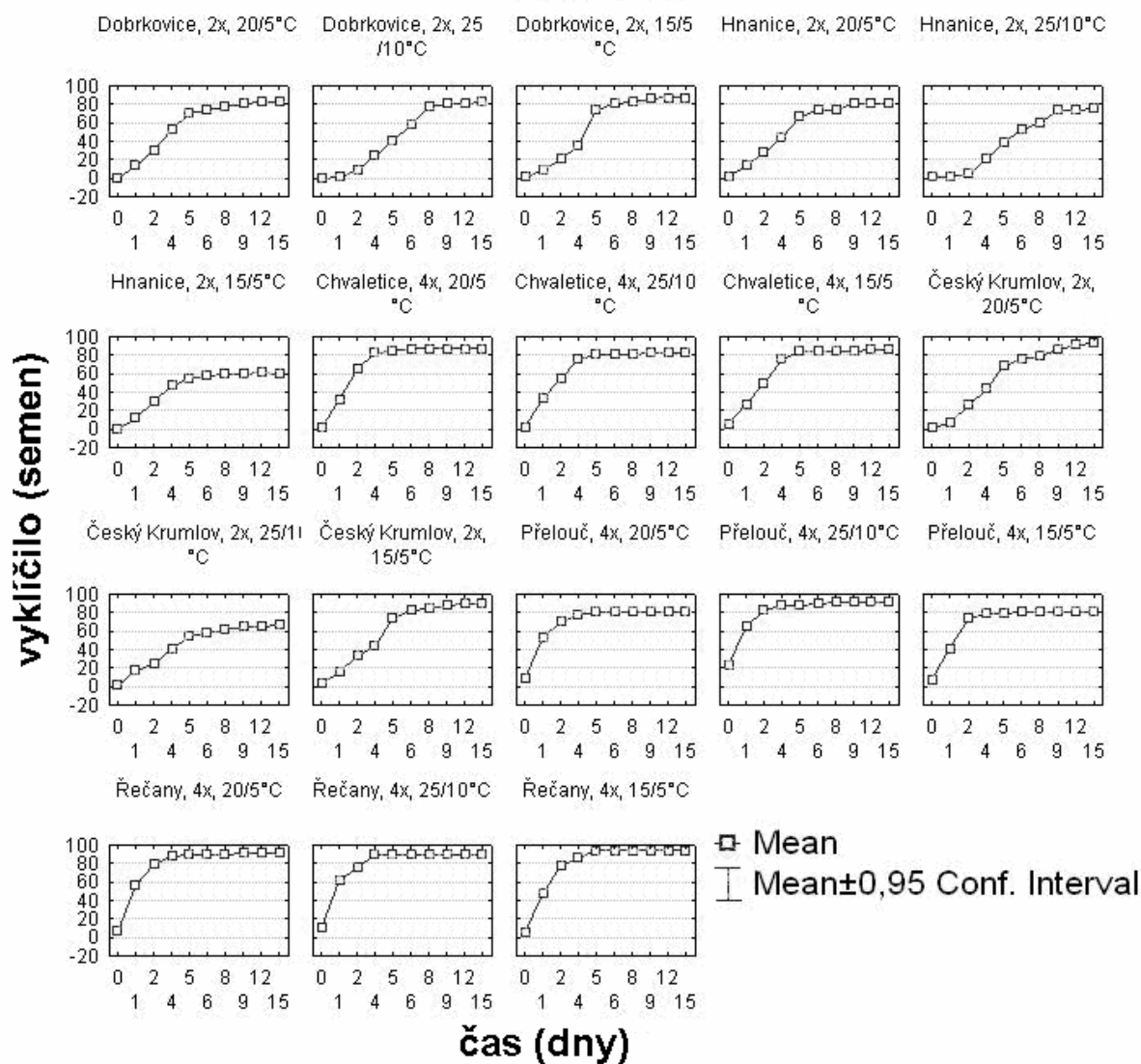
Rozdíly byly v začátku klíčení – v pokusu 1 trvalo 6–7 dní, než rostliny začaly klíčit, v pokusu 2 klíčila téměř okamžitě. Některá semena byla napadena různými plísněmi, i přes to však většina z nich bez problémů klíčila. U několika semen bylo pozorováno vykulení se embrya bez apikální části či bez kořene. Po ukončení pokusu jsem odhadla počet ještě živých semen, sporné jsem obarvila TTC, následně podélně rozřízla a zkoumala obarvení embrya (fialové – živé, neobarvené prázdné; ale pokud by bylo napadeno plísní existuje riziko, že se obarví plíseň, ačkoliv samotné embryo již bude mrtvé). Na tomto principu jsem rozhodla o množství živých a neživých semen: Krumlov – 9 prázdných, Dobrkovice 17, Hnanice 15; tetraploidní populace – Řečany – 3, Přelouč 16, Chvaletice – 11.

Tabulka 9: Výsledné klíčení bez a se stratifikací, počet vyklíčených semen na konci pokusu (vždy ze 300 semen).

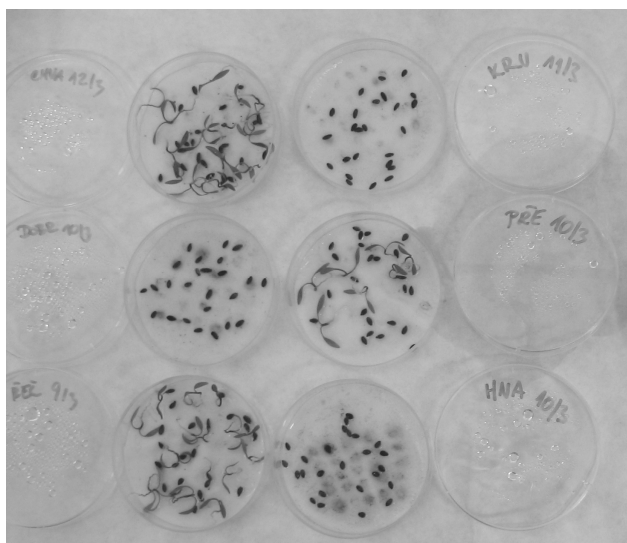
klíčení bez stratifikace	15/5°C	20/5°C	25/10°C	klíčení po stratifikaci	15/5°C	20/5°C	25/10°C
diploid	2	50	199	diploid	236	257	225
tetraploid	139	199	268	tetraploid	259	258	266

V pokusu jedna se výrazně odlišovaly diploidní populace od tetraploidních ve své klíčivosti (viz obr. 39) – v nejnižší teplotě vyklíčila jen dvě semena. Málo klíčila i ve střední, ale nejvíce v nejvyšší. Naopak v pokusu 2 (obr. 38, 40) se tyto markantní rozdíly již víceméně smazaly a diploidní populace klíčily nejvíce ve střední teplotě.

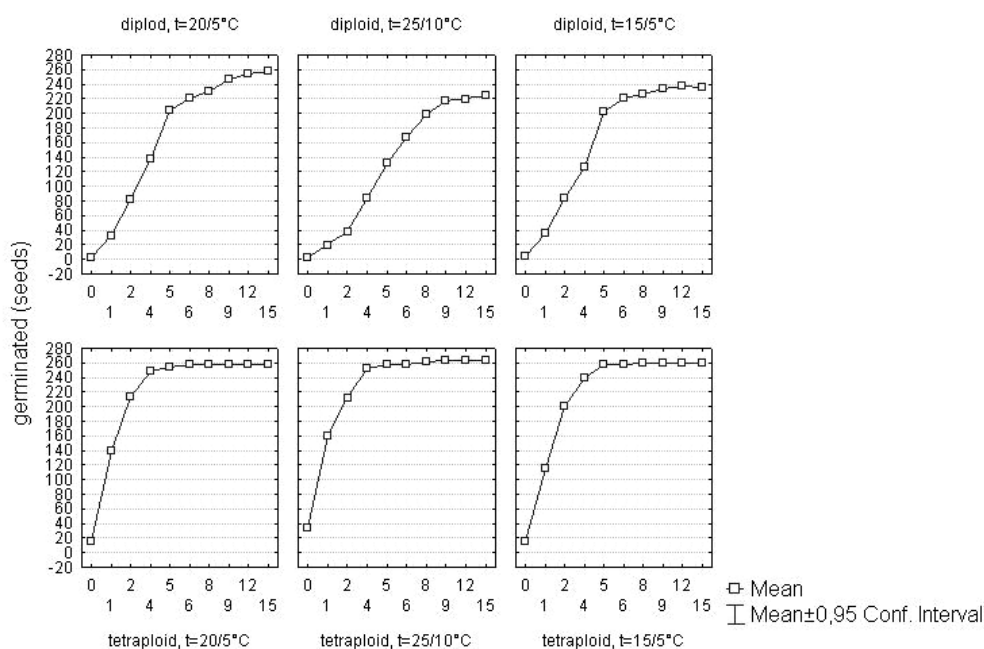
Tetraploidní populace klíčily v obou pokusech dobře, ačkoliv v prvním byl ještě znát vliv teploty a v druhém pokusu už ne.



Obr. 38: Grafy znázorňující klíčení semen z jednotlivých diploidních a tetraploidních populací po stratifikaci v závislosti na teplotě a čase.



Obr. 39: Rozdílnost v klíčení diploidního (KRU, DOBR, HNA) a tetraploidního (CHVA, PŘE, ŘEČ) cytotypu ve stejné teplotě bez stratifikace. Semena z diploidních rostlin ještě neklíčí, semena z tetraploidních rostlin už mají vyvinuté děložní lístky.



Obr. 40: Na grafech je znázorněno klíčení semen z diploidních a tetraploidních populací v závislosti na teplotě a čase po teplotní stratifikaci. Z grafů je zřejmé, že diploidním semenům nejvíce vyhovovala průměrná teplota – 20°C/5°C, při níž jednak klíčení začalo dříve ale vyklíčilo i nejvíce semen. Naopak tetraploidi zřejmě nejsou na teplotu tolik vázaní.

5.3 Diskuze

V rámci pokusu jsem zjistila, že se obě ploidie signifikantně odlišují v dynamice klíčení. Semena z tetraploidních populací klíčila dobře za všech podmínek a dříve (což může souviset i s případnou expanzivností v šíření se cytotypu).

Naproti tomu diploidní cytotyp klíčil dobře jen při nejvyšší teplotě, (při nejnižší de facto vůbec, ve střední teplotě vyklíčila jen jedna šestina semen). Po stratifikaci se ovšem situace obrátila a nejlépe klíčil v teplotě prostřední.

Zjistili jsme tedy, že se obě ploidie liší svojí klíčivostí a snad i optimem. To pěkně koreluje i s mapkou rozšíření diploidního a tetraploidního cytotypu na našem území. Tetraploidi se nacházejí zejména v teplých nížinách – např. Polabí, diploidi spíše ve vyšších polohách, kde lze předpokládat nižší teploty a dřívější nástup zimy. To by také vysvětlovalo, proč se diploidní cytotyp nachází více ve vyšších polohách – pokud tetraploidní semena jsou částečně bez dormance a schopny vyklíčit v jakékoliv teplotě, mohlo by se jim ve vyšších polohách stát, že mladé rostlinky klíčící hned po opadu na zem vymrznou s nástupem zimy. Diploidní semena sice začnou růst později, ale určitě ne v zimě (obzvlášť pokud nepředcházelo chladné období).

Jsem si vědoma, že některé populace zvolené do pokusu jsou geograficky velmi blízko u sebe a použitím semen ze vzdálenějších lokalit by mohly vzejít odlišné výsledky. Obzvlášť zajímavé by bylo zopakovat experiment ještě s tetraploidními semeny z jižního Slovenska, kde tetraploidní rostliny snad rostou na ekologicky odlišných stanovištích než tetraploidi v českých zemích. Zároveň ale vím, že *Libnotis pyrenaica* plodí poněkud nevyzpytatelně - ač spousta rostlin, do květu může jít na některých lokalitách v určité roky třeba jen jediná rostlina či naopak vykvétou téměř všechny rostliny najednou (možná tak přilákají více opylovačů). Také by tento experiment vyžadoval opětovné navštívení a nasbírání semen na onech šesti lokalitách, aby nezkreslilo výsledky stárí a uchovávání semen.

Samozřejmě si uvědomuji, že můj předpoklad shodné ploidní úrovně semen se zjištěnou ploidní úrovní populace na základě deseti rostlin z této lokality, nemusí být pravdivý (atypický jedinec, vada v tvorbě semene např. z neredukovaných gamet atp.). Na druhou stranu jsem po celou dobu výzkumu nenarazila na žádnou smíšenou populaci krom jedné polské, dále jsem 72 rostlin z druhého experimentu vysadila a nechala růst v zahradních podmínkách Průhonické pokusné zahrady. U těchto rostlin jsem si ploidii ověřila na cytometru a shodovala se s naším předpokladem u všech rostlin.

6. Pár slov ke květní biologii, opylování a heteroploidnímu křížení

Nejenom návštěvnost květů (Ollerton et al. 2007) je pro rostlinu důležitá, ale hlavně schopnost opylovače specificky přenést co největší množství pylu na co nejvíce dalších květů – a ideálně jiné rostliny, aby se zabránilo opylení v rámci téhož jedince (geitonogamie). Takže ačkoliv některé druhy např. much navštěvují květy hojně, neznamená to, že jsou nejefektivnějším opylovačem a naopak. Zároveň je nutné připomenout, že spektrum opylovačů se může měnit nejen v závislosti na denní době, ale jejich početnost a zastoupení se může měnit i meziročně.

U mnou studovaného druhu jsem zaznamenala jiné vůně, které rostlina produkovala v různou denní dobu, což by mohlo nasvědčovat lákání rozdílných opylovačů během dne anebo během různých fenologických fází kvetení. Na rostlině se vystřídalo mnoho bezobratlých (viz obrazová příloha), kteří by všichni mohli být potenciálními opylovači, včetně mravenců. Mravenci sáli květní šťávy poměrně hodně, mšicemi však zabýdli jen jednu z vysazených 72 rostlin, ačkoliv se hojně pohybovali cca na 1/3 všech žebřic.

Nejprve vykvétá terminální okolík od okrajových okolíčků ke středu okolíčků a od okrajových okolíčků ke středu okolíku. *Libanotis pyrenaica* je proterandrická rostlina s výrazně oddělenou fází zralosti prašníků a fází receptivity blizen. Toto oddělení zabraňuje

autogamii v rámci jednoho okolíčku, ale v rámci celého okolíku nebo celé rostliny již nemusí být stoprocentní.

Jednotlivé květy se otvírají od okraje okolíčku k jejich středu, stejně jako postupně rozkvétají jednotlivé okolíčky v rámci jednoho okolíku. Až když i prostřední květy dozrají v pylové fázi a opadnou tyčinky, pak teprve se opět od krajových květů začínají prodlužovat čnělky, na nichž postupně dozrávají blizny. Většina květů za zralosti ztrácí okvětní lístky. Postupně od okrajů se začínají zvětšovat dvouploidistové semeníky, které dají vznik schizokarpu, jenž se rozpadne na dvě merikarpia nesená konektivem. Zralá semena obvykle snadno opadávají.

V době receptivity blizen v terminálním okolíku začínají dozrávat prašníky na nejnížší (nejbazálnější) větví odbočující z hlavní lodyhy. Tento mechanismus má zřejmě napomoci opylení v místech, kde se nenachází další kvetoucí jedinec, který by mohl rostlinu opylit. Také lze říci, že v terminálním květenství lze nalézt semena největší a zřejmě též nejvíce životaschopná. Květy ba celá květenství na postranních větvích mnohdy zasychají, nestihnou se opylit nebo vyvinout semena. Každopádně mechanismus rozložení kvetení do co nejdelší doby se jeví jako velmi progresivní.

Po odkvětu se okolíky ještě trochu prodlužují a semeníky se na jednotlivých paprscích k sobě více přibližují, čímž se stahuje celé květenství. Okvětní lístky jsou již opadané, stejně jako kališní cípy (ty obvykle opadávají velmi záhy po rozkvětu), postupně se z každého květu vyvíjejí dvě merikarpia. V této době je rostlina oblíbená zejména pavouky, kteří si přes okolíky staví pavučiny a zakládají tak obydlí i další pavoučí generace. Méně ovšem tito návštěvníci vyhovují samotné rostlině – takové okolíky jsou více náchylné k zadržování vody, menšímu proudění vzduchu a tudíž mnohem náchylnější k nákaze různými druhy plísní.

Rostlina tedy umožňuje existenci spoustě dalších organismů nejen produkcí pylu a šťáv, ale též poskytuje úkryt anebo loviště pro sršně a vosy.

6.2 Heteroploidní křížení v rámci jednoho druhu

Míra vzájemné kompatibility nebo na druhé straně reprodukční izolace mezi cytotypy téhož druhu má zásadní význam pro zachování nebo narušení genetické integrity cytotypů v jejich kontaktních zónách (Barton 1985). Mezi hlavní mechanismy omezující vzájemné křížení patří ekologická diferenciace (např. Felber-Girard 1996), rozdílná doba kvetení (Husband & Schemske 2000), preference rozdílných opylovačů (Segraves & Thompson 1999), kompetice mezi pylovými zrny a genetická nebo genomická inkompatibilita zabráňující tvorbě zygoty a/nebo embrya (např. Baldwin & Husband 2011).

6.3 Metodika

Experimentální křížení diploidních a tetraploidních rostlin *Libanotis pyrenaica* probíhalo v létě 2015 v Experimentální zahradě Botanického ústavu AV ČR v Průhonicích na venkovním záhonu. Vybrala jsem 6 diploidních a 6 tetraploidních rostlin (z lokalit Hnanice, Český Krumlov, Nové Dobrkovice; Chvaletice, Přelouč, Řečany). Nejprve jsem odstranila tyčinky z vybraných okolíček na terminálních okolicích diploidních i tetraploidních rostlin. Okolíčky jsem opylovala celkem třikrát (z časových důvodů se ani vícekrát nedalo). Vždy dva okolíčky byly opyleny rostlinou téže ploidie, rostlinou jiné ploidie a mateřskou rostlinou (případně jinou větví téže rostliny). Okolíčky byly zabaleny do sáčků z organzy a po opylení odstraněny až v době zralosti semen. Křížení se týkalo pouze vybraných rostlin (tak, aby byla šance, že se potká s dalšími kvetoucími správné ploidie). Z terminálního okolíku byly vždy opyleny dva okolíčky rostlinou o stejné ploidní úrovni, dva rostlinou s jinou ploidní úrovní a dva toutéž rostlinou. Všechny květy navzdory proterandrii byly vykastrovány před dozráním prašníků, čímž byla znemožněna autogamie i nurse efekt u pylu.

Dále byly ponechány na vybraných jedincích kontrolní okolíčky - vykastrované i nevykastrované. Zbytek záhonu byl ponechán přirozenému opylování hmyzem. Každé květenství jsem opylovala třikrát, bylo-li to možné, protože blizny získávaly receptivitu postupně od okraje okolíčku k jeho středu. Pyl byl nanášen specificky na jednotlivé čnělky za pomoci pinzety (celou utrženou tyčinkou nebo pylem naneseným na plochou stranu pinzety – k tomuto nestandardnímu způsobu jsem byla nucena přikročit kvůli nemožnosti přiblížení si rostlin vzhledem k jejich velikosti (některé až dva metry vysoké) a opylovat za pomoci celého květenství také nebylo vhodné, protože rostlina nejen rozkvétá postupně (a hrozil by nedostatek pylu) ale hlavně tvoří pylu velmi málo (proto nepřipadal v úvahu ani štěteček).

Pak už byly okolíčky jen přikryty sáčky z monofilu či organzy a nechány na rostlinách do sběru semen.

6.4 Předběžné výsledky a diskuse

Křížením rostlin stejných ploidí semena vznikala.

Po křížení rostlin odlišných ploidních úrovní jsem zjistila, že se semena buď vůbec nevytvoří anebo jich vzniká pouze velmi málo. Lze se tedy předběžně domnívat, že se zde setkáváme s triploidním blokem, kdy zárodek zaniká ještě před vývojem semene z důvodu špatného poměru genetické informace maternální ku paternální v endospermu.

Pokud je tetraploidní rostlina produkující redukované gamety - v tomto případě tedy

diploidní - opylena gametou z diploidní rostliny - tedy haploidní, dochází k nevyrovnanému poměru maternální ku paternální 5:1. Pokud je mateřská rostlina diploidní a je opylena pylem z tetraploidní rostliny (tedy diploidním), je výsledné zastoupení maternálního a paternálních sádek v endospermu 2:2; obojí se tak odlišuje od poměru běžného při homoploidním křížení (2:1).

Pokud se přesto zárodky s tímto problémem dokáží vyrovnat, může dojít k překonání triploidního bloku (tzv. triploidní most) a mohou vznikat triploidní hybridy.

Rostliny z čeledi Apiaceae se vyznačují malým nedovyvinutým zárodkem a velkým množstvím živného pletiva endospermu, což může být také důvodem k nižší četnosti různých ploidních úrovní v této čeledi.

K možnosti, že po heteroploidním křížení u *L. pyrenaica* semena vznikají jen vzácně, by přispívala i skutečnost, že se mi v přírodě nepodařilo odhalit žádnou triploidní rostlinu.

7. Závěr

Studie je zhodnocením ploidní diversity, genetické variability a vybraných biologických vlastností druhu *Libanotis pyrenaica* ve střední Evropě. Byly potvrzeny dvě ploidní úrovně, diploidní a tetraploidní, v literatuře vzácně zmiňované triploidní rostliny nebyly nalezeny; stejně tak až na jednu výjimku nebyly zjištěny smíšené populace diploidních a tetraploidních rostlin. Diploidní cytotyp je rozšířený v celém studovaném území, zejména na přirozených skalnatých stanovištích. Tetraploidní cytotyp byl zjištěn zejména v panonské oblasti s přesahem do karpatské oblasti na středovýchodním Slovensku a ve východním Polabí v ČR, které zatím představuje severozápadní areálovou hranici tohoto cytotypu.

Sekvenování dvou úseků chloroplastové DNA ukázalo značnou genetickou diversitu, v souboru 70 analyzovaných rostlin bylo rozlišeno 46 haplotypů. Genetická diversita nicméně nemá zřejmý geografický pattern ani nesouvisí s ploidní diferenciací, mnohé haplotypy zahrnují jak diploidní, tak i tetraploidní rostliny a je zřejmé, že tetraploidie vznikali opakovaně a polytopně z různých linií diploidního cytotypu. Poměrně dobře je podpořena skupina zahrnující haplotypy z Rumunska, Slovenska a východního Rakousku. Zajímavé je i to, že všechny rostliny z norských populací patří ke stejnému haplotypu, nicméně bez zkoumání dalších skandinávských populací lze o genetické uniformitě severských populací jen spekulovat; ke stejnému haplotypu pak patří i rostliny ze dvou českých populací (Milešovka, Štramberk). Nebyl potvrzen předpoklad, že v poslední době expanzní populace v českém východním Polabí patří k jednomu haplotypu, naopak jde o několik ne zcela příbuzných haplotypů.

Zajímavý může být význam hradních zřícenin, které fungují nejspíš jako „neorefungia“, která umožňují rostlinám udržet se v krajině a možná se i příležitostně šířit. Nebyla ale prokázána příbuznost hradních rostlin s rostlinami z přirozených stanovišť v blízkém okolí.

Nedomnívám se, že by hradní zříceniny umožňovaly následnou expanzi *L. pyrenaica*, spíš se bude jednat opravdu pouze o refugia – alespoň v českých zemích, kde rostlina zřejmě nemá tolik příhodných podmínek k výskytu jako např. na Slovensku.

Klíčení semen v experimentálních podmínkách je významně podmíněno ploidí (tetraploidní semena klíčí obecně lépe než diploidní), teplotou a stratifikací (stratifikovaná semena klíčí více a rychleji). Plovatelnost semen, potenciálně významná vzhledem k šíření zejména tetraploidního cytotypu podél řek, se u diploidních a tetraploidních semen neliší. Předběžná analýza morfologických znaků ukázala odlišnosti mezi diploidními a

tetraploidními rostlinami, zejména v počtu okolíčků, obalíčků, výšce rostlin, počtu laloků či listů; diploidní a tetraploidní rostliny se liší i celkovým habitem.

8. Seznam použité literatury

- Alexeeva, T. V., Vasil'eva, M. G., Daushkevich, J. V. & Pimenov, M. G. (1994): IOPB chromosome data 8. – Int. Organ. Pl. Biosyst. Newslett. 23: 11–12.
- Ashraf, M., Sandra, P. J., Saeed, T. & Bhatti, M.K. (1979): Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae: XLI - *Seseli libanotis* (L.) W. Koch (chota eachga) seed oil. – Pakistan Journ. Sci. Industr. Res. (Pakistan) 22: 322–324.
- Baack, E. J. (2004): Cytotype segregation on regional and microgeographic scales in show buttercups (*Ranunculus adoneus*: Ranunculaceae). – Amer. Journ. Bot. 91: 1783–1788.
- Baldwin, S.J. & Husband, B.C. (2011): Genome duplication and the evolution of conspecific pollen precedence. – Proc. Roy. Soc. London, Ser. B: Biol. Sci., 278: 2011–2017.
- Barton, N.H. & Hewitt, G. M. (1985): Analysis of hybrid zones. Annu Rev Ecol Syst 16: 113–148.
- Bastlová, D., Květ, J., Kubátová, B., Trávníček, P., Čurn, V. & Suda, J. (2008): Variabilita ve fenologii a ploidních hladinách původních a invazních populací kypřeje vrbice (*Lythrum salicaria*) v širším geografickém měřítku. – Zprávy Čes. Bot. Společ. 43, Mater. 23: 103–112.
- Beest, te M., Roux, J. J., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubešová, M. & Pyšek, P. (2012): The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. – Ann. Bot. 109: 19–45.
- Begon, M., Townsend, C. R. & Harper, J. L. (2006): Ecology: from individuals to ecosystems. Ed 4. – Blackwell Publishing, Oxford.
- Benkert, D., Fukarek F. & Korsch, H. (1996): Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Ostdeutschlands (Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Berlin, Sachsen-Anhalt, Sachsen, Thüringen). – G. Fischer, Jena.
- Beug, H.-J. (2004): Leitfaden der Pollenbestimmung für Mitteleuropa und angrenzende Gebiete. – Verlag Friedrich Pfeil, Munich.
- Bobrov, E. G., Fedchenko, B. A., Korovin, E. P., Krishtofovich, A. N., Linchevskii, L. A., Poyarkova, A. I. & Shishkin, B. K. [ed] (1973): Flora of the U.S.S.R.: (Flora SSSR). V. XVI. – Jerusalem. <http://archive.org/stream/floraofussr1617bota#page/240/mode/2up>
- Bonnier, G. (1911): Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique: comprenant la plupart des plantes d'Europe. Vol. 4. – Delachaux et Niestlé, Neuchâtel.
- Bretagnolle, F., Thompson, J.D. & Lumaret, R. (1995): The influence of seed size variation on seed germination and seedling vigour in diploid and tetraploid *Dactylis glomerata* L. – Ann. Bot. 76: 607–615.
- Cauwet, A. M. (1968): Contribution a l'étude caryologique des *Ombellifères* de la partie orientale des Pyrénées. – Natur. Monspel., ser. bot., 19: 5–27.
- Clement, M., Posada, D. et Crandall, K. (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. – Mol. Ecol. 9: 1657–1660.
- Comai, L. (2005): The advantages and disadvantages of being polyploid. – Nature Rev. Genet. 6: 836–846.
- Constance, L., Chuang, T.-L. & Bell, C.R. (1976): Chromosome numbers in Umbelliferae V. – Amer. Journ. Bot. 63: 608–625.
- Coops, H. (1995): Seed dispersal, germination and seedling growth of six helophyte species in relation to water-level zonation. – Freshwater Biol. 34:13–20.

- Čulíková, V. (2006):** Rostlinné makrozbytky z prostor raně středověkého opevnění v sondě 236 na jz. okraji předhradí v Libici nad Cidlinou. – Archeol. Rozhl. LVIII: 527–539.
- Danihelka, J., Chrtek, J. Jr. & Kaplan, Z. (2012):** Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – Preslia 84: 647–811.
- Duchesne, E. A. (1836):** Repertoire des plantes utiles et des plantes veneneuses du globe. – Paris.
- Duvigneaud, J. (1965):** Le caractère de glabréité des fruits dans le groupe du *Seseli libanotis* (Umbelliferae). – Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique / Bulletin van de Koninklijke Belgische Botanische Vereniging, T. 98, Fasc. 2, pp. 215–228.
- Dobročaeva, D. N., Kotov, M. I., Prokudin, Ju. N. et al. (1987):** Opređelitel' vysšich rastenij Ukrainy. – Naukova Dumka, Kiev.
- Doğan Güner, E., Duman, H. & Pinar, N. M. (2011):** Pollen morphology of the genus *Seseli* L. (Umbelliferae) in Turkey. – Turk. Journ. Bot. 35 : 175–182.
- Doležal, J., Greilhubert, J. & Suda, J. (2007a):** Flow cytometry with plants: Analysis of genes, chromosomes and genomes, Wiley-VCH, Weinheim.
- Doležal, J., Greilhubert, J. & Suda, J. (2007b):** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – Nat. Prot. 2: 2233–2244.
- Dostál, J. (1950):** Květena ČSR a ilustrovaný klíč k určení všech cévnatých rostlin, na území Československa planě rostoucích nebo běžně pěstovaných. – Přírodovědecké nakladatelství, Praha.
- Dostál, J. (1958):** Klíč k úplné květeně ČSR. – Nakl. ČSAV, Praha.
- Downie, S. R., Katz-Downie, D. S., Spalik, K. (2000):** A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. – Amer. Journ. Bot. 87: 76–95.
- Dudits, D., Hadlaczky, G., Lévi, E., Fejér, O., Haydu, Z., & Lázár, G. (1977):** Somatic hybridisation of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. – Theor. Appl. Gen. 51: 127–132.
- Dvořák, F. (1979):** Morphology of chromosomes of the genus *Seseli* L. – Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purkyn. Brun. 9: 19–42. [cit. sec. www 10]
- Dvořák, F. & Dadáková (1977):** IOPB chromosome numbers reports LVIII. – Taxon 26: 564–565
- Ebert, D. & Peakall, R. (2009):** A new set of universal de novo sequencing primers for extensive coverage of noncoding chloroplast DNA: new opportunities for phylogenetic studies and cpSSR discovery. – Mol. Ecol. Res. 9: 777–783.
- Ericsson, S. (2004):** Arthandbok Fältkiktsarter för Nationell Inventering av Landskapet i Sverig. NILS. – Sveriges Lantbruksuniversitet Institutionen för skoglig resurshushållning och geomatik. Arbetsrapport 137: 48.
- Felber-Girard, M., Felber, F. & Buttler, A. (1996):** Habitat differentiation in a narrow hybrid zone between diploid and tetraploid *Anthoxanthum alpinum*. – New Phytol. 133: 531–540.
- Fischer, M. A., Adler, W. & Oswald, K. (1994):** Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein & Südtirol. – E. Ulmer, Stuttgart, Wien.
- Fischer, M. A., Oswald, K. & Adler, W. (2008):** Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. Ed. 3. – Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, Linz.
- Gardé, A. & Malheiros-Gardé, N. (1949):** Contribuição para o estudo cariológico da familia *Umbelliferae*. – Agron. Lusit. 11(2): 91–140. [cit. sec. <http://www.anthos.es/index.php?lang=en>]
- Greilhubert, J., Doležal, J., Lysák, M. A. & Benett, M. D. (2005):** The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to Describe Nuclear DNA Contents. – Ann. Bot. 95: 255–260.

- Hall, T.A. (1999):** BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.
- Halverson, K., Heard, S. B., Nason, J. D. & Stireman, J. O. (2008):** Origins, distribution, and local cooccurrence of polyploid cytotype in *Solidago altissima* (Asteraceae). – Amer. Journ. Bot. 95: 50–58.
- Hanzl, M. (2010):** Ekologické a evoluční procesy v primární kontaktní zóně cytotypů chrastavce rolního (*Knautia arvensis* agg.). – Ms., 40 p. [Bakalářská práce; depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha]
- Hegi, G. (1927):** Illustrierte Flora von Mittel-Europa: mit besonderer Berücksichtigung von Österreich, Deutschland und der Schweiz. Vol. 5/2. – München.
- Heywood, V. H. & Tutin, G. T. (1968):** Flora Europaea, Rosaceae to *Umbeliferae*. Vol. 2. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Hlavaček, A., Jasičová, M. & Zahradníková, K. (1984):** *Libanotis* Zinn – Rebrica. – In: Bertová, L., Hlavaček, A., Holub, J., Jasičová, M., Šourková, M. & Zahradníková, K. (eds), Flóra Slovenska IV./1, p. 243–246, Veda, Bratislava.
- Hroudová Z., Moravcová L. & Zákravský P. (1997):** Effect of anatomical structure on the buoyancy of achenes of two subspecies of *Bolboschoenus maritimus*. – Folia Geobot. Phytotax. 32: 377–390.
- Hultén, E. (1950):** Atlas över växternas utbredning i Norden: fanerogamer och ormbunksväxter = Atlas of the distribution of vascular plants in NW Europe. – Generalstabens litografiska anstalt förlag, Stockholm.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. (2000):** Ecological mechanisms of reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium*. – J. Ecol. 88: 689–701.
- Husband, B. C. (2004):** The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. – Biol. Journ. Linn. Soc. 82: 537–546.
- Husband, B. C. & Schemske, D. W. (1998):** Cytotype distribution at a diploid-tetraploid contact zone in *Chamerion* (*Epilobium*) *angustifolium* (*Onagraceae*). – Amer. Journ. Bot. 85: 1688–1694.
- Jarvis, Ch. E., Reduron, J.-P., Spencer, M. A. & Cafferty, S. (2006):** Typification of Linnaean plant names in *Apiaceae*. – Taxon 55: 211.
- Jäger E. J. (ed.) (2011):** Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundband. Ed. 20. – Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jordanov, D. & Kožuharov, S. (1982):** Flora Reipublicae popularis Bulgaricae. Vol. 8. – Aedibus Academiae Scientiarum Bulgaricae, Sofia.
- Kay, Q.O.N. (1969):** The origin and distribution of diploid and tetraploid *Tripleurospermum inodorum* (L.) Schultz Bip. – Watsonia 7:130–141.
- Kiviniemi, K. & Telenius, A. (1998):** Experiments on adhesive dispersal by wood mouse: seed shadows and dispersal distances of 13 plant species from cultivated areas in southern Sweden. – Ecography 21: 108–116.
- Klan, Z. (1947):** Srovnávací anatomie plodů rostlin okoličnatých oblasti republiky Československé. – Česká akademie věd a umění, Praha.
- Koutecký, P., Štěpánek, J. & Baďurová, T. (2012):** Differentiation between diploid and tetraploid *Centaurea phrygia*: mating barriers, morphology and geographic distribution. – Preslia 84: 1–32.
- Kovanda, M. (1977):** Polyploidy and variation in the *Campanula rotundifolia* complex. part II. (Taxonomic) 2. Revision of the groups vulgares and Scheuchzerianae in Czechoslovakia and adjacent regions. – Folia Geobot. Phytotax. 12: 23–89.
- Kovaříková, J. (1978):** Vnější a vnitřní stavba plodů vybraných zástupců rodu *Seseli* L. a *Libanotis* Hill. – Ms., 148 p. [Dipl. práce; depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha]

- Krásná, I. (2008):** Cytogeografie *Cardamine amara* v České republice a objasnění původu tetraploidních populací. – Ms., 147 p. [Dipl. práce; depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha, on-line: http://botany.natur.cuni.cz/fer/DP_Krasna.pdf]
- Kroufek, K., Nepraš, K., Zdvořák, P. et al. (2012):** Floristické mapování Českého středohoří II (Ústí n. L. – Sebzubín). – Severočes. Přír., 43(1):45-61.
- Kubát, K., Hrouda, L., Chrtek, J. jun., Kaplan, Z., Kirschner, J. & Štěpánek, J. [eds] (2002):** Klíč ke květeně České republiky. – Academia, Praha.
- Laane, M. M., Croff, B. E. et Wahlstrom, R. (1983):** Cytotype distribution in the *Campanula rotundifolia* complex in Norway, and cyto-morphological characteristics of diploid and tetraploid groups. – Hereditas 99: 21–48.
- Levin, D. A. (1983):** Polyploidy and novelty in flowering plants. – Amer. Naturalist 122 (1): 1–25.
- Levin, D. A. (2002):** The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford series in ecology and evolution. – Oxford University Press, New York.
- Lhotská, M. (1968):** Karpologie und Karpobiologie der tschechoslowakischen Vertreter der Gattung *Bidens*. – Rozpr. Českoslov. Akad. Věd, ser. math.-natur., 78/10:1–85.
- Linné, C. von (1753):** Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus secundum systema sexuale digestas, vol. 1. Laurentii Salvii.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležal, J. & Santos, C. (2006):** Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. – Ann. Bot. 98: 515–527.
- Loureiro, J., Trávníček, P., Rauchová, J., Urfus, T., Vít, P., Štech, M., Castro, S. & Suda, J. (2010):** The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. – Preslia 82: 3–21.
- Lumaret, R., Guillermin, J.-L., Delay, J., Ait Lhaj Loutfi, A., Izco, J. & Jay, M. (1987):** Polyploidy and habitat differentiation in *Dactylis glomerata* L. from Galicia (Spain). – Oecologia 73: 436–446.
- Mable, B. K. (2004):** Why polyploidy is rarer in animals than in plants?: myths and mechanisms. – In: Leitch, A. R., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Leitch, I. J. & Pires, J. C., Biological relevance of polyploidy: ecology to genomics, p. 453–466, Biol. J. Linn. Soc. 82.
- Májovský, J., et al. (1970):** Index of chromosome numbers of Slovakian flora (Part 1). – Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comen., Bot. 16: 1–26.
- Markova, M. & Robeva, P. N. (1972):** Reports. – In: Löve, A. [ed.], IOPB chromosome number reports XXXVI., Taxon 21: 333–346.
- Matejic, J. S., Džamić, A. M., Mihajilov-Krstev, T., Randelović, V. N., Krivošej, Z. D. & Marin, P. D. (2012):** Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three *Seseli* L. taxa. – J. Biol. 7: 1116–1122.
- Meusel, H., Rauschert, S., Weinert, E. & Jäger, E. (1978a):** Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Band 2. Karten.– Gustav Fischer, Jena.
- Meusel, H., Rauschert, S., Weinert, E. & Jäger, E. (1978b):** Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Band 2. Text. – Gustav Fischer, Jena.
- Mirek, Z., Piękoś-Mirkowa, H., Zając, A. & Zając, M. (2002):** Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist. – W. Szafer Institute of Botany, Kraków.
- Moore, D. M. (1982):** Flora Europaea Check-List and Chromosome Index. Vol. 1. University Press, Cambridge.

- Moravcová, L., Pyšek, P., Jarošík, V., Havlíčková, V. & Zákrevský, P. (2010):** Reproductive characteristic of neophytes in the Czech Republic: traits of invasive and non-invasive species. – *Preslia* 82: 365–390.
- Mozolová, K. (2007):** Cytogeografie a populační struktura druhu *Pimpinella saxifraga* L. – Ms., 158 p. [Dipl. práce; depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha]
- Mráz, P., Šingliarová, B., Urfus, T. & Krahulec, F. (2008):** Cytogeography of *Pilosella officinarum* (Compositae): Altitudinal and longitudinal differences in ploidy level distribution in the Czech Republic and Slovakia and the general pattern in Europe. – *Ann. Bot.* 101: 59–71.
- Mráz, P., Bouchier, R. S., Treier, U. A., Schaffner, U. & Müller-Schärer, H. (2011):** Polyploidy in phenotypic space and invasion context: a morphometric study of *Centaurea stoebe* s.l. – *Int. J. Pl. Sci.* 172: 386–402.
- Mráz, P. (2012):** Význam polyploidie, hybridizácie a asexuálneho rozmnožovania v evolúcii cievnatých rastlín. – Habilitačná práce, Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie.
- Müller, K. (2005):** SeqState – primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. – *Appl. Bioinformatics* 4: 65–69.
- Nylander, J.A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & Nieves-Aldrey, J.L. (2004):** Bayesian phylogenetic analysis of combined data. – *Syst Biol.* 53(1):47– 67.
- Ollerton, J., Killick, A., Lamborn, E. & Whiston, M. (2007):** Multiple meaning and modest: On the many ways to be a generalist flower. – *Taxon* 56: 717–728.
- Opiz, M. (1852):** Seznam rostlin květeny české. Malá encyklopedie nauk, X. – Praha.
- Oprea, A. (2005):** Lista critică a plantelor vasculare din România. – Editura universităţii “Alexandru Ioan Cuza”, Iaşi.
- Otto, S. P. & Whitton, J. (2000):** Polyploid incidence and evolution. – *Ann. Rev. Genet.* 34: 401–37.
- Ozturk, A., Ozturk, S. & Kartal, S. (2000):** The characteristics and uses of herbs added to herby cheeses in Van. – *Herb Journ, Syst. Bot.* 7:167–181.
- Ozturk, S. & Ercisli, S. (2006):** Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Seseli libanotis*. – *World Journ. Microbiol. Biotechnol.* 22: 261–265.
- Page, R. D. M. (2001):** TreeView, Glasgow University, Glasgow, UK.
- Pardo, C. (1981):** Estudio sistemático del género *Seseli* L. (Umbellifereae) en la Península Ibérica. – *Lazaroa* 3:163–188.
- Pawłowski, B., Koczwara, M. & Szafer, W. (1960):** Flora Polska: rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych. T. IX, Dwuliścienne wolnopłatowe-dwuokwiatowe. Cz. VII. – Państwowe wydawnictwo naukowe, Kraków.
- Peev & Andreev, N. (1978):** Reports. – In: Löve, Å. [ed.], IOPB Chromosome numbers reports, LXII. – *Taxon* 27: 534–535.
- Peschkova, G. A. [ed.] (2006):** Flora of Siberia: Geraniaceae–Cornaceae, vol. 10. – Science Publishers, Enfield.
- Pignatti, S. (1982):** Flora d'Italia. Vol. 2. – Edagricole, Bologna.
- Pimenov, M. G. (1993):** The Identity of Himalayan "*Seseli sibiricum*" (Umbelliferae). – *Kew Bull.* 48: 781–785.
- Pimenov, M. G., Dauschkevich, J. V., Vasil'eva, M. G. & Kljuykov, E. V. (1996):** Reports (716–748). – In: Kamari, G., Felber, F. & Garbari, F., Mediterranean chromosome number reports 6, *Fl. Medit.* 6: 288–307.

- Pogan E., Wcisło H., Izmailow R., Przywara L. et al. (1982):** Further studies in chromosome numbers of Polish Angiosperms. Part XVI. – *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.* 24: 159–189.
- Presl, J. S. (1846):** Wšeobecný rostlinopis, čili: Popsání rostlin we všelikém ohledu užitečných a škodlivých. Díl 1. Spisů musejních číslo XXIII. 730.
- Prívovníková, H. (2013):** *Libanotis pyrenaica* – unikátní polyploidní komplex v čeledi Apiaceae. – Ms. [Bakalář. práce, depon in: Knihovna katedry botaniky PřF UK Praha, dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/130776>].
- Ramsey, J. & Schemske, D. V. (1998):** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. – *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 467–501.
- Reduron, J.P. (2008):** Ombellifères de France 4: Monographie des Ombellifères (*Apiaceae*) et plantes alliées, indigènes, naturalisées, subspontanées, adventices ou cultivées de la flore française. 5 – *Bull. Soc. Bot. Centre-Ouest*, ser. n., no spec. 29.
- Retina, T. A. (1985):** On karyotypes of some species of the genus *Seseli* L. (Umbelliferae). – *Biol. Nauki* 3(255): 72–75. [cit. sec. Goldblatt & Johnson, 2003 (www 8)]
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003):** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Rostovtseva, T. S. (1976):** Čísla chromosom nekotorych vidov semejstva *Apiaceae* v južnoj Sibiri. – *Bot. Žurn.* 61(1): 93–99.
- Rostovtseva, T. S. (1982):** Čísla chromosom nekotorych vidov semejstva *Apiaceae* III. – *Bot. Žurn.* 67(2): 206–210.
- Rostovtseva, T. S. (1984):** Chromosomnye čísla cvetkovych rastenij Sibiri i Dal'nego Vostoka. – *Nauka. Novosibirsk*. [cit. sec. Goldblatt & Johnson, 2003 (www 8)]
- Rothera, S. L. & Davy, A. J. (1986):** Polyploidy and habitat differentiation in *Deschampsia cespitosa*. – *New Phytol.* 102: 449–467.
- Rothmaler, W., Werner, K. & Schubert, R. (1984):** Exkursionsflora für die Gebiete der DDR und der BRD. Bd. 2, Gefäßpflanzen. Ed. 12. – Volk u. Wissen, Berlin.
- Rothmaler, W., Vent, W. & Schubert, R. (1994):** Exkursionsflora von Deutschland. Band 4, Gefäßpflanzen: Kritische Band. Ed. 8. – Volk u. Wissen, Berlin.
- Rothmaler, W., Werner, K. & Jäger, E. (2007):** Exkursionsflora von Deutschland. Band 3, Gefäßpflanzen: Atlasband. Ed. 11. – Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Săvulescu, T. (1958):** Flora Republicii Populare Romîne. Vol. 6. – Editura Academiei Republicii Populare Romîne, Bucuresti.
- Segraves, K.A. & Thompson, J.N. (1999):** Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. – *Evolution* 53: 1114–1127.
- Sell, P. & Murrell, G. (2009):** Flora of Great Britain and Ireland. Vol. 3. – Cambridge University Press, Cambridge.
- Semerenko, L. V. (1985):** Čísla chromosom nekotorych vidov flori Belorusii. – *Bot. Žurn.* 70: 130–132.
- She, Menglan, Pimenov, M. G., Kljuykov, E. V. & Watson, M. F. (2005):** *Libanotis*. – In: Wu Zheng-yi, Raven, P. & Hong Deyuan (eds), *Flora of China* 14: 117–122, Missouri Botanical Garden, St. Louis; Science Press, Beijing.
- Shelly, G. B., Cashman, T. J., Starks, J. L. (2006):** Adobe Photoshop CS2: Complete Concepts and Techniques. – Course Technology Press, Boston.

- Schlaepfer, D. R., Edwards, P. & Billeter, R. (2010):** Why only tetraploid *Solidago gigantea* (Asteraceae) became invasive: a common garden comparison of ploidy levels. – *Oecologia* 163: 661–673.
- Schönfelder, P. & Bresinsky, A. (1990):** Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen Bayerns. – Ulmer, Stuttgart.
- Schönfelder, P. & Haeupler, H. (1988):** Atlas der Farn- und Blütenpflanzen der Bundesrepublik. – Ulmer, Stuttgart.
- Schwarzová, J. (2012):** Obsah DNA a AT/GC genomový poměr v čeledi *Apiaceae*. – Ms, 86 p. [Dipl. práce; depon. in: PřF Masarykovy univerzity, Brno]
- Schönswetter, P., Lachmayer, M., Lettner, C., Prehler, D., Rechnitzer, S., Reich, D.S., Sonnleitner, M., Wagner, I., Huelber, K., Schneeweiss, G.M., Trávníček, P. & Suda, J. (2007):** Sympatric diploid and hexaploid cytotypes of *Senecio carniolicus* (Asteraceae) in the Eastern Alps are separated along an altitudinal gradient. – *Journ. Pl. Res.* 120: 721–725.
- Silvestre, I. (1978):** Contribución al estudio cariológico de la familia *Umbelliferae* en la Península Ibérica. – *Lagascalia* 7(2): 163–172.
- Simmons, M. P. & Ochoterena, H. (2002):** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. – *Syst. Biol.* 49: 369–381.
- Slavík, B. & Tomšovic, P. (1997):** *Libanotis pyrenaica* (L.) Bourgeau – žebřice pyrenejská. – In: Slavík, B. (ed.), *Květena České republiky* 5, p. 360–363, Academia, Praha.
- Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (1999):** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. – *Tree* 14: 348–352.
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., de Pamphilis, C. W., Wall, P. K. & Soltis P. S. (2009):** Polyploidy and angiosperm diversification. – *Amer. Journ. Bot.* 96: 336–348.
- Soltis, P.S. & Soltis, D.E. (2012):** Polyploidy and genome evolution. – Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Sonnleitner, M., Flatscher, R., García, P. E., Rauchová, J., Suda, J., Schneeweiss, G. M., Hülber, K. & Schönswetter, P. (2010):** Distribution and habitat segregation on different spatial scales among diploid, tetraploid and hexaploid cytotypes of *Senecio carniolicus* (Asteraceae) in the Eastern Alps. – *Ann. Bot.* 106: 967–977.
- Spalik, K., Reduron, J.-P. & Downie, S. R. (2004):** The phylogenetic position of *Peucedanum* sensu lato and allied genera. The phylogenetic position of *Peucedanum* sensu lato and allied genera and their placement in tribe Selineae (Apiaceae, subfamily Apioideae). – *Pl. Syst. Evol.* 243: 189–210.
- Sterner, R. (1922):** The continental element in the flora of South Sweden. – *Geograf. Ann.* 4: 333–334.
- Stevens, P.F. (2001):** onwards: Angiosperm Phylogeny Website (Version 9). Dostupné z <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. [8.8.2016]
- Suda, J. & Trávníček, P. (2006):** Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry – new prospects for plant research. – *Cytometry A* 69(4): 273–280.
- Suda, J., Weiss-Schneeweiss, H., Tribsch, A., Schneeweiss, G. M., Trávníček, P. & Schönswetter (2007):** Complex distribution patterns of di-, tetra-, and hexaploid cytotypes in the European high mountain plant *Senecio carniolicus* (Asteraceae)1. – *Amer. Journ. Bot.* 94: 1391–1401.
- Suda, J. (2011):** Průtoková cytometrie a její využití v botanice). – *Zprávy Čes. Bot. Společ.* 46, Mater. 25: 21–42.

- Swofford, D.L. (2002):** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. – Sinauer Associates, Sunderland.
- Šemberová, K. (2013):** Populační struktura a fenotypová diferenciace *Campanula moravica*. – Ms., 140 p. [Dipl. práce; depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha]
- Šmarda, J. (1961):** Vegetační poměry Spišské kotliny: studie travinných porostů. – Vyd. Slovenskej akademie vied, Bratislava.
- Šmarda, J. (1963):** Rozšíření xerothermních rostlin na Moravě a ve Slezsku: zprávy o vědecké činnosti 1. Brno. [Přílohy – mapa 145]
- Španiel, S., Marhold, K., Hodálová, I. & Lihová, J. (2008):** Diploid and tetraploid cytotypes of *Centaurea stoebe* (Asteraceae) in Central Europe: Morphological differentiation and cytotype distribution patterns. – *Folia Geobot.* 43: 131–158.
- Štěpánek, J. (1997):** *Pimpinella saxifraga* L. – bedrník obecný. – In Slavík, B. (ed.), Květena České republiky 5, p. 340–343. Academia, Praha.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G & Bouvet, J (1991):** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Pl. Mol. Biol.* 17: 1105–1109.
- Tosun, A. & Özkal, N. (2003):** *Seseli* L. (Umbelliferae) türlerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri. – *Journ. Fac. Pharm., Ankara*, 32: 269–284.
- Treier, U.A., Broennimann, O., Normand, S. et al. (2009):** Shift in cytotype frequency and niche space in the invasive plant *Centaurea maculosa*. – *Ecology* 90: 1366–1377.
- Trávníček, P., Eliášová, A. & Suda, J. (2010):** The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. – *Preslia* 82: 149–163.
- Trávníček, P., Dočkalová, Z., Rosenbaumová, R., Kubátová, B., Szelağ & Chrtek, J. (2011a):** Bridging global and microregional scales: ploidy distribution in *Pilosella echioides* (Asteraceae) in central Europe. – *Ann. Bot.* 107: 443–454.
- Trávníček, P., Kubátová, B., Čurn, V., Rauchová, J., Krajníková, E., Jersáková, J. & Suda, J. (2011b):** Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. – *Ann. Bot.* 107: 77–87.
- Uhrová, D. (1984):** Rozšíření druhu *Libanotis pyrenaica* na území ČSSR. – Ms., 57 p. [Dipl. práce; depon. in: Knihovna katedry botaniky PřF UK, Praha]
- Vaněček, J. (1969):** Květena Horažďovicka (Materiál k floristickému výzkumu Horažďovicka). – Krajské středisko státní památkové péče a ochrany přírody v Plzni, Plzeň.
- Vitek, E., Kiehn, M., Pascher, K. et al. (1992):** Beiträge zur Flora von Österreich – weitere Chromosomenzählungen. – *Vehr. Zool.-Bot. Ges. Österreich* 129:215–226.
- Wetschnig, W. & Leuten, G. H. (1991):** Chromosomenzahlen Karntner Gefäßpflanzen (Teil 2, Doldenblütler – *Apiaceae* = *Umbelliferae*). – *Linzer Biol. Beitr.* 23(2): 457–481.
- Zajac, A. & Zajac, M. (2001):** Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce: Distribution atlas of vascular plants in Poland. – Instytut Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.

8.1 Seznam použitých webových stránek

www 1. 15.3.2016 Mapa s rozšířením ve Francii

http://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/610580

www 2. 10.7.2015 Flora Nordica (Fröberg, L., 2008 – Apiaceae)

<http://www.floranordica.org/publicreview/publicreview.html>

www 3. 10.4. 2013 Mapa Pyrenejského poloostrova s výskytem *Seseli libanotis*

<http://www.anthos.es/index.php?lang=en> 11.4.2013

www 4. 13.5. 2015 Mapa Německa

<http://www.floraweb.de/MAP/scripts/esrimap.dll?name=florkart&cmd=mapflor&app=distflor&ly=gw&taxnr=5540>

www 5. 13.5. 2015 Mapa Bavorska a ploidie

http://www.bayernflora.de/de/info_pflanzen.php?taxnr=5540

www 6. 14.4. 2016 Flora iberica (10. svazek, str. 205)

www.floraiberica.es

www 7. 10.4. 2013 Rozcestník adres

http://botanicaljourneys.com/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=2

www 8. 30.3. 2013 Databáze Goldblatt, P. & JOHNSON D. E. [eds.] (2003): Index to plant chromosome numbers 1975–2000. Missouri Botanical Garden, St. Louis. Dostupné z

<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?projectid=9>

www 9. 10.4. 2013 Karyologická databáza kaprad'orostov a semenných rostlín

Slovenska Marhold, K., Mártonfi, P., Mered'a, jun. P., Mráz, P., Hodálová, I., Kolník, M., Kučera, J., Lihová, J., Mrázová, V., Perný, M., Valko, I.

<http://www.chromosomes.sav.sk/main/index.php>

www 10. 7.1. 2013 Databáze chromozomů ČR

http://www.ibot.cas.cz/sites/File/menu/vedecka_cinnost/oddeleni_a_vyzkumna_centra/oddeleni_taxonomie/c1_ii_a_chromozomove_pocty.xls

www 11. 14.4. 2013 Mapa Británie a Irska

http://www.bsbi.maps.org.uk/atlas/map_page.php?spid=1907.0&dateorder=ASC

www 12. 10.5. 2013 Ellenbergovy indikační hodnoty

<http://statedv.boku.ac.at/zeigerwerte/?art=seseli>

www 13. 20.10.2015 FLDOK

<http://florabase.cz/databanka/index.php?page=about-presented-data&PHPSESSID=bi64j4e3872g966hmur25cvjh3>

www 14. Past - Hammer, R. (1999-2016): Past. PAleontological Statistic. – Reference manual. Natural History Museum, University of Oslo. Software viz

<http://folk.uio.no/ohammer/past/>

www 15. Fabox

<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>

8.2 Seznam map k rozšíření *Libanotis pyrenaica*

Benkert et al., 1996 (map. 1077)

Hlavaček et al., 1984 (ma. 44, str. 250) – Slovensko

Hultén, 1950 (map. 1991, str.342) – Skandinávie

Meusel et al., 1978a (str. 313) – Evropa, Asie, Afrika

Pardo, 1981 (map. 2, str. 169) – Pyrenejský poloostrov

Slavík & Tomšovic, 1997 (5:31) – Česká republika

Sterner, 1922 (map. 20, str.334) – Jih Švédska

Uhrová, 1984 (příloha) – Československo

Šmarda, 1961 (map. 43 str. 241) – Spišská kotlina

Šmarda, 1963 (map. 145) – Morava a Slezsko

Schönfelder & Bresinsky, 1990 (map. 1148)

Schönfelder & Haeupler, 1988 (map. 1069)

Zajac & Zajac 2001 (map. 331) – Polsko

a z webových stránek:

www 1. Francie

www 2. Norsko, Švédsko, Dánsko, Finsko

www 3. Pyrenejský poloostrov

www 4. Německo

www 5. Bavorsko

www 11. Británie a Irsko